



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**O doente drepanocítico: a modulação da resposta imune e a
suscetibilidade para Síndrome Torácica Aguda**

Ionela Alexandra Filofteia Toader

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Março, 2019



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902



UNIVERSIDADE
NOVA
DE LISBOA

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**O doente drepanocítico: a modulação da resposta imune e a
suscetibilidade para Síndrome Torácica Aguda**

Autor: Ionela Alexandra Filofteia Toader

Orientador: Doutora Catarina Martins, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Doutor Luís Miguel Borrego, Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Elementos bibliográficos resultantes do trabalho desta Dissertação

Comunicações em formato Poster

Martins C, **Toader I**, Nunes G, Lopes T, Borrego LM. Application of bulk lysis protocols for the evaluation of rare immune subsets: profile of iNKT cells in Sickle cell disease. Poster. Apresentado no Congresso da European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) 2018 - At the shore of future cytometry – 13 a 15 de Setembro de 2018 – Valência, Espanha.

Agradecimentos

Mais uma etapa concluída, mais uma vitória conseguida! No final deste percurso olho para trás e vejo que esta vitória não seria conseguida sem a presença de todos aqueles que estiveram comigo ao longo deste caminho e que ajudaram, cada um da sua forma, a que este trabalho acontecesse.

Quero agradecer em primeiro lugar aos meus orientadores, que deste o início desta jornada acreditaram em mim e me deram a oportunidade de poder realizar este trabalho.

Especialmente à Professora Doutora Catarina Martins, que desde o primeiro dia demonstrou ser uma pessoa espetacular, sempre pronta a ajudar no que os outros precisam e especialmente uma excelente profissional. Obrigada por toda a sua paciência e por tudo aquilo que me ensinou ao longo da minha estadia no laboratório, estou-lhe eternamente grata.

Ao Professor Doutor Luís Miguel Borrego, pelas suas palavras de incentivo quando me via um pouco mais desmotivada ou em baixo e pelos conhecimentos que me forneceu ao longo deste projeto.

Ao Hospital D. Estefânia e em particular à Dra. Ana Cordeiro que permitiram que este projeto fosse realizado.

De salientar também a importância do resto dos membros do Laboratório, nomeadamente a técnica Glória Nunes, a Dra Teresa Lopes e a Filomena Jorge, que sempre me ajudaram em tudo o que podiam e me fizeram sentir parte desta família, um Muito Obrigada por tudo!

Ao meu colega de laboratório Ricardo Monteiro, que também esteve ao mesmo tempo que eu a fazer o seu estudo no laboratório e que passou esta jornada ao meu lado. Foi um grande apoio e principalmente uma grande companhia ao longo deste projeto.

Por fim, as pessoas mais importantes da minha vida, a minha família, os meus pais e a minha irmã por estarem sempre do meu lado e por terem sempre acreditado em mim e me apoiado em tudo o que podiam, mesmo que por vezes as situações tenham sido complicadas. Obrigada por tudo!

Resumo

A Drepanocitose, Doença das Células Falciformes (DCF), é uma hemoglobinopatia caracterizada pela mutação do gene da β hemoglobina, em que a molécula normal hemoglobina (HbA) sofre alteração para a forma de hemoglobina S (HbS). Estes doentes apresentam maior suscetibilidade a infeções, com alterações reportadas na imunidade inata e na imunidade adaptativa. Concretamente encontram-se nestes doentes, deficiências na secreção de IgM, diminuição as células B de memória IgM+, células T CD4 e T CD8, e aumento das células de T CD4 de Memória. Também os níveis séricos de MBL e CD40L se encontram alterados. No doente drepanocítico, a Síndrome Torácica Aguda (STA) é das principais causas de internamento, morbilidade e mortalidade, surgindo por causa infecciosa, mas também na sequência de crises vaso-oclusivas, características destes doentes. Do ponto de vista da terapêutica, a Hidroxiureia é um dos fármacos de eleição.

O objetivo deste estudo foi a caracterização do perfil imune da população pediátrica com Drepanocitose do Hospital D. Estefânia – Centro Hospitalar de Lisboa Central (HDE), e a posterior avaliação deste perfil em função da ocorrência de STA e da instituição de Hidroxiureia. Assim, foram recolhidas amostras de sangue de 30 doentes diagnosticadas com Drepanocitose, analisadas no Laboratório de Imunologia da NMS|FCM. Foram avaliadas distintas populações celulares por Citometria de Fluxo, e em particular foi utilizado o tubo PIDOT, do consórcio Euroflow, com a respetiva base de dados. Foram também utilizadas técnicas imunoenzimáticas e imunofluorescentes para o doseamento dos mediadores solúveis MBL e CD40L. Para esta avaliação foram utilizados soros controlo do Laboratório de Imunologia, obtidos a partir de uma população pediátrica saudável acompanhada no HDE. O grupo de doentes foi posteriormente dividido de acordo com a história de STA e com a instituição ou não de Hidroxiureia.

Na generalidade dos doentes, as subpopulações celulares apresentaram-se dentro dos valores de referência da Base de Dados EuroFlow, com as alterações observadas em alguns doentes a traduzir o descrito na literatura. Em relação à ocorrência de episódios de STA, apenas a população de células dendríticas plasmacitoides se apresentou diminuída nos doentes com história de STA, o que pode representar um possível elemento a considerar do ponto de vista de marcadores de risco. Em relação à terapêutica com Hidroxiureia, observou-se diminuição de células T CD4+ Memória Central e Efetoras, bem como de Monócitos e Basófilos nos doentes com terapêutica, que também evidenciaram valores mais elevados de células T TCR $\gamma\delta$. Estes elementos, devidamente confirmados poderão vir a ter aplicação futura na monitorização da terapêutica, do ponto de vista da resposta imune. Relativamente à avaliação dos marcadores séricos, observou-se diminuição de MBL e aumento de CD40L nos doentes, ao encontro do que tem sido descrito. Não houve alterações nas comparações de doentes com e sem STA, e com e sem terapêutica.

Em conclusão, este estudo pioneiro na aplicação das estratégias EuroFlow ao doente com Drepanocitose, suporta a sua aplicabilidade no acompanhamento destes doentes, nomeadamente na avaliação potenciais fatores de risco para o desenvolvimento de STA e na avaliação da eficácia da terapêutica, a nível da resposta imune.

Palavras-chave:

Drepanocitose

Citometria de Fluxo

Síndrome Torácica Aguda

Perfil imune

Hidroxiureia

Abstract

Sickle Cell Disease (SCD) is an hemoglobinopathy characterized by the mutation of the β -hemoglobin gene, in which the normal hemoglobin (HbA) molecule changes to the hemoglobin S (HbS) form. These patients are more susceptible to infections, with reported changes in innate immunity and adaptive immunity. Specifically, in these patients there are deficiencies in IgM secretion, decrease in IgM+ memory B cells, CD4 and CD8 T cells, and increased Memory CD4 T cells. Also, the serum levels of MBL and CD40L are altered. In patients with sickle cell disease, Acute Chest Syndrome (ACS) is the main cause of hospitalization, morbidity and mortality, arising from infectious causes, but also from vaso-occlusive crises, which are characteristic of these patients. From the therapeutic point of view, Hydroxyurea is one of the drugs of choice.

The aim of this study was to characterize the immune profile of the pediatric population with Drepanocytosis of the Hospital D. Estefânia - Centro Hospitalar de Lisboa Central (HDE), and the subsequent evaluation of this profile according to the occurrence of ACS and the use of Hydroxyurea. Blood samples were collected from 30 patients diagnosed with Drepanocytosis and were analyzed at the Immunology Laboratory of NMS | FCM. Distinct cell populations were evaluated by Flow Cytometry, and in particular the PIDOT tube from the EuroFlow consortium was used with its Database. Immunoenzymatic and immunofluorescent techniques were also used for the determination of the soluble mediators MBL and CD40L. For this evaluation control sera from the Immunology Laboratory were used, obtained from a healthy pediatric population followed at HDE. Patients were further divided according to the history of ACS and to the use Hydroxyurea.

In most patients, cell subpopulation presented values within the reference values of the EuroFlow Database, with the alterations observed in some cases translating what has been reported in literature. As for the occurrence of ACS, only the population of plasmacytoid dendritic cells was decreased in patients with a history of ACS, which may represent a possible element to be considered as a risk marker for the occurrence of ACS. Regarding the use of Hydroxyurea, decreased Central and Effector Memory CD4+ T, as well as Monocytes and Basophils were observed in patients under therapy, which also presented increased TCR $\gamma\delta$ T cells. These elements, properly confirmed, may have future application in monitoring the effect of therapy from the immune point of view. Regarding the evaluation of serum markers, a decrease in MBL serum levels and an increase in CD40L serum levels were observed, in accordance with data from previous reports.

In brief, this study, using for the first time the EuroFlow strategies in patients with SCD, supports the application of these platforms in this disease, namely in the evaluation of potential risk markers for the development of ACS, and even in the evaluation of therapeutics efficacy from the immune point of view.

Keywords:

Drepanocytosis

Flow Cytometry

Acute Chest Syndrome

Immune profile

Hydroxyurea

Lista de Abreviaturas e Siglas

% – Percentagem

μl – Microlitro

ml – mililitro

sd – desvio padrão

ADCC – Citotoxicidade celular mediada por anticorpos

APCs – Células apresentadores de antígeno

BCR – Recetor da célula B

CBA – *Cytometric Bead Array*

CD – *Cluster of differentiation*

CD40L – CD40 ligando

CHLC – Centro Hospitalar de Lisboa Central

DAMPs – *Damage-associated molecular patterns*

DCF – Drepanocitose ou Doença das Células Falciformes

DCs – Células dendríticas

EDTA – Anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético

Fab – *Fragment antigen binding*

Fc – *Fragment crystallizable*

FcεRI – Recetor de alta afinidade para IgE

FSC – *Forward Scatter*

G-CSF – Fator estimulador de colónias de granulócitos- *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*

HbF – Hemoglobina Fetal

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência - *High-performance liquid chromatography*

HU – Hidroxiureia

ICAM – Molécula de adesão intercelular

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

INF – Interferão

iNKT – Células T Natural Killer invariantes

LTC – Leucotrieno

MBL – Lectina de ligação à manose - *Mannose-Binding lectin*

MHC – Complexo major de histocompatibilidade - *Major Histocompatibility Complex*

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response*

NF-κB – fator nuclear κB

NK – Célula Natural Killer

NKT- Célula T Natural Killer

NMS|FCM – NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns*

PID – Imunodeficiências Primárias – *Primary Immunodeficiency*

PIDOT – *Primary Immunodeficiency Orientation Tube*

PRRs – *Pattern Recognition Receptors*

SSC – *Side Scatter*

STA – Síndrome Torácico Aguda

Tc – Células T citotóxicas

TCR – Recetor de célula T

TD – Diferenciação terminal

Tfh – Células T helper foliculares

TGF – Fator transformador de crescimento - *Transforming growth factor*

Th – Células T helper

TIR – Toll/IL-1R - Domínio de sinalização homólogo ao recetor de interleucina-1

TLR – *Toll-Like Receptors*

TNF – Fator de necrose tumoral - *Tumor necrosis factor*

Treg – Células T reguladoras

TRIF – *TIR-domain containing adapter inducing interferon*

VCAM – Molécula de adesão celular vascular - *Vascular cell adhesion molecule*

WBC – *White Blood Cells* (leucócitos)

Índice

Elementos bibliográficos resultantes do trabalho desta Dissertação	i
Agradecimentos.....	iii
Resumo	v
Abstract.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Índice.....	xiii
1. Introdução	1
1.1 Sistema imunológico	1
1.2 Imunidade Inata.....	1
1.3 Imunidade Adaptativa.....	5
1.4 Linfócitos T.....	5
1.5 Linfócitos B.....	7
1.6 Citometria de Fluxo	8
1.7 O Consórcio EuroFlow	12
1.8 Drepanocitose.....	13
1.9 Crises vaso-oclusivas.....	14
1.10 Síndrome torácica aguda.....	15
1.11 Disfunção esplénica.....	16
1.12 Alterações imunes em DCF	17
1.13 Objetivos	21
2. Material e Métodos.....	23
2.1 População-alvo	23
2.2 Ética e Confidencialidade	23
2.3 Obtenção das amostras.....	24
2.4 Processamento das amostras para análise celular	24
2.4.1 Citometria de fluxo	24
2.4.2 Imunofenotipagem Celular	25
2.4.3 Quantificação celular	25
2.4.4 PIDOT- <i>Primary Immunodeficiency Orientation Tube</i>	25
2.4.5 Caracterização dos perfis de diferenciação T e NKT.....	28
2.5 Análise dos ficheiros.....	29
2.6 Doseamento de Mediadores Imunes Solúveis	36
2.6.1 Estudo da proteína humana MBL – Lectina ligadora de manose	36

2.6.2	Estudo da proteína CD40L – CD40 ligando.....	38
2.7	Análise Estatística	43
3.	Resultados	45
3.1	Caracterização Demográfica	45
3.2	Imunofenotipagem Celular - Analise com a Base de Dados EuroFlow para PIDOT ..	47
3.3	Avaliação das Subpopulações Celulares de acordo com a Base de Dados EuroFlow para PIDOT em Doentes com e sem história de STA	52
3.4	Avaliação das Subpopulações Celulares de acordo com a Base de Dados EuroFlow para PIDOT em Doentes com e sem Terapêutica instituída	56
3.5	Caracterização dos perfis de diferenciação de células T e células NKT em doentes com DCF	60
3.6	Caracterização dos perfis de diferenciação de células T e células NKT em doentes com DCF com e sem história de STA.....	61
3.7	Caracterização dos perfis de diferenciação de células T e células NKT em doentes com DCF com e sem instituição de terapêutica	62
3.8	Estudo de mediadores séricos.....	63
3.8.1	Estudo da proteína MBL – Lectina de ligação à manose	64
3.8.2	Estudo da proteína CD40L	66
4.	Discussão e Conclusões	69
5.	Referências Bibliográficas	79

1. Introdução

1.1 Sistema imunológico

O ser humano está constantemente a ser sujeito a vários tipos de agressões e cabe ao sistema imunológico, composto por uma complexa rede de órgãos, células e moléculas, combater essas agressões e manter o seu equilíbrio (1). Maioritariamente, a resposta imunológica divide-se em duas linhas de defesa, de acordo com a especificidade e a rapidez da resposta (2). Estas duas linhas de defesa distinguem-se sobretudo pelos seus diferentes mecanismos e recetores de reconhecimento imunológico (3).

A imunidade inata, de primeira linha, rápida e inespecífica é constituída por células fagocíticas como macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e monócitos e outras células que também medeiam a resposta inflamatória como eosinófilos, basófilos, mastócitos e células *Natural Killer* (NK), às quais se podem associar ainda complexas interações de citocinas. Por sua vez, a imunidade adaptativa, de segunda linha, mais eficiente e específica para cada agente patogénico é assumida particularmente pelas células B e T (4).

1.2 Imunidade Inata

A Imunidade inata engloba uma panóplia de células, que estão envolvidas na montagem de uma resposta contra a agressão.

Os macrófagos são essenciais para uma boa compreensão da defesa do organismo e do funcionamento da resposta imunitária inata. Atuando como elementos em contínua vigilância dos tecidos em que se encontram, participam de forma ativa na homeostasia e integridade do organismo (5). Estas células podem ter três tipos de origens diferentes: o saco vitelino, as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea ou o fígado fetal (6).

Quando ativados, os macrófagos possuem mecanismos de regulação negativa da resposta imunitária inata através da ativação de vias anti-inflamatórias e da fagocitose de células apoptóticas, que no final levam à estabilização e homeostasia do tecido (7).

A ativação dos macrófagos só é possível graças à existência de recetores da linha germinativa, presentes na sua superfície. A especificidade de cada recetor é predefinida

geneticamente, sendo que estes recetores reconhecem padrões moleculares presentes nos microrganismos infecciosos (3). Assim, os recetores de reconhecimento de padrões da resposta inata (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*) reconhecem os padrões moleculares dos microrganismos patogénicos (PAMPs – *Pathogen associated molecular patterns*). Diferentes tipos de PRRs interagem com variados PAMPs ativando vias de sinalização e desencadeando respostas distintas (8).

Lipopolissacarídeos, lipoproteínas, peptidoglicano e ácidos lipoproteicos são alguns dos PAMPs de origem bacteriana, sendo o β -glucano um padrão molecular característico dos fungos. No caso dos vírus, os principais padrões reconhecidos pelos recetores da resposta inata são os ácidos nucleicos virais (9).

Dentro dos PRRs, os recetores *Toll-Like* (TLR- *Toll-Like Receptors*), expressos em macrófagos e DCs, entre outros, têm capacidade de reconhecer diversos tipos de PAMPs (10). Os TLR são proteínas transmembranares do tipo I constituídas por domínios extracelulares com várias repetições ricas em leucina e pelo domínio Toll/IL-1R, um domínio de sinalização homólogo ao recetor de IL(interleucina)-1 (TIR) (11). Os TLRs estão divididos em subfamílias de acordo as suas sequências primárias e com o tipo de reconhecimento de PAMPs: os TLR1, TLR2 e TLR6 reconhecem lipoproteínas, o TLR3 reconhece RNA de cadeia dupla, o TLR4 reconhece lipopolissacáridos, o TLR5 reconhece a flagelina, os TLR7 e TLR8 reconhecem RNA de cadeia simples, o TLR9 reconhece DNA e o TLR11 reconhece a profilina (8). Quando acontece o reconhecimento de PAMPs, ou mesmo DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*), pelos TLR, estes recetores recrutam moléculas adaptadoras como MyD88 (*Myeloid differentiation primary response*) ou TRIF (*TIR-domain containing adapter inducing interferon- β*) que contêm o domínio TIR, dando origem a eventos de sinalização (12). Neste processo, os macrófagos são ativados, iniciando-se a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as IL-1 β e IL-6, que por sua vez promovem o recrutamento dos leucócitos ou a chegada de proteínas séricas aos locais onde está a ocorrer a infeção (13).

Na resposta inata encontramos também as DCs, altamente especializadas na captura e apresentação dos antígenos aos linfócitos T, bem como de produção de citocinas (14).

Estas células migram da medula óssea para os tecidos periféricos e é sobretudo aí, nos

tecidos, que capturam os antígenos através de processos como a fagocitose e a macropinocitose.

Após esta captura começam a sofrer alterações a nível fenotípico e funcional, passando de DCs imaturas a células maduras. Para isso, desenrolam-se eventos como a reorganização do citoesqueleto, a perda de estruturas adesivas e a aquisição de mobilidade (15), que permitem agora a sua migração para os órgãos linfoides secundários, onde chegam já como DCs maduras, assumindo sobretudo a função de células apresentadoras de antígeno capazes de interagir com os linfócitos T (16).

Os monócitos, tal como as células dendríticas e os macrófagos, fazem parte do sistema fagocitário mononuclear (20) e são células efetoras imunes, que possuem recetores de quimiocinas e PRRs, que intervêm respetivamente no seu transporte do sangue para os tecidos e também no reconhecimento dos agentes patogénicos (17).

Os neutrófilos são células produzidas na medula óssea durante o processo de hematopoiese, através da ação de vários estímulos, entre eles o fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF- *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) (18). Na periferia, os neutrófilos maduros têm um papel fundamental na resposta inflamatória pois migram rapidamente para os locais onde está a ocorrer a infeção, desempenhando aí um papel microbicida (19). São mesmo as primeiras células a migrar para os tecidos, ativadas por estímulos como proteínas do complemento, quimiocinas, citocinas, complexos antígeno-anticorpo ou ainda produtos bacterianos

Também na medula óssea se produzem outros granulócitos como os eosinófilos, que são leucócitos multifuncionais especializados no combate à infeção, principalmente com ação antiparasitária e envolvidos em reações alérgicas (20). O conteúdo dos grânulos dos eosinófilos é característico, existindo nestes compartimentos proteína básica principal, proteína catiónica eosinofílica, peroxidase eosinofílica e neurotoxina derivada dos eosinófilos, que conferem características citotóxicas a estas células (1).

Os basófilos são formados e amadurecem na medula óssea e correspondem a menos de 1% dos leucócitos existentes no sangue periférico (1). Por outro lado, os mastócitos derivam de células-tronco hematopoiéticas, encontrando-se particularmente as células maduras ao nível dos tecidos e não na circulação. De facto, os mastócitos imaturos fazem

sobretudo a sua diferenciação no próprio local para onde migram (21). Apesar de hoje em dia ser aceite que representam duas linhagens celulares distintas, basófilos e mastócitos apresentam semelhanças funcionais, por exemplo, nas respostas a infeções parasitárias ou nas respostas alérgicas (22). Concretamente, os mastócitos, libertam citocinas como a IL-4 e a IL-13, bem como histamina e mediadores lipídicos como é o caso das prostaglandinas e leucotrienos (23).

As células Natural Killer diferenciam-se a partir do precursor linfoide que se encontra na medula óssea e, à periferia, representam aproximadamente 10% das células mononucleares existentes no sangue periférico (24). Estas células são ativadas por estímulos como a IL-15 e a IL-12, e promovem também a destruição de células infetadas ou danificadas, após reconhecimento nestas células de sinais ativadores que interajam com os seus recetores (25).

As células NK lisam as células-alvo (tumoriais ou infetadas por vírus) através da secreção de perforinas e granzimas (2). As perforinas criam poros na membrana celular por onde penetram as granzimas, que induzem a apoptose (2).

Ainda na resposta inata encontramos o sistema do complemento. Este sistema, que tem como principais funções a lise de microrganismos, a ativação do processo inflamatório e ainda a opsonização imunológica (26), apresenta 3 modos distintos de ativação: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas (27). A via clássica é dependente da presença de anticorpos ligados a antígenos. De facto, a sua ativação ocorre quando há uma ligação antígeno-anticorpo, (28), permitindo a ligação do complexo proteico C1q, e a posterior ativação das proteases a ele associadas C1r e C1s (29). A via alternativa é ativada pela interação do C3b com a superfície da célula patogénica (30)

A via das lectinas é ativada quando a Lectina de ligação à manose (MBL) se liga a resíduos de manose na superfície de agentes patogénicos (28).

A MBL é uma proteína pertencente à família das lectinas dependentes de Ca^{+} , presente no soro e secretada pelo fígado (31). O gene responsável pela codificação desta proteína é o MBL2 que se localiza no cromossoma 10 (32). Esta proteína faz parte do sistema imunitário inato e é bastante importante na idade infantil, em que não ainda não há uma resposta adequada da imunidade adquirida (33).

1.3 Imunidade Adaptativa

As respostas adaptativas são mediadas por recetores específicos das células T e B, formados durante o desenvolvimento destes linfócitos. Ao contrário dos recetores da resposta inata, o recetor da célula T (TCR) e o recetor da célula B (BCR) resultam da recombinação da linha germinativa, o que leva à produção de um repertório de recetores com enorme diversidade, gerado aleatoriamente. À periferia, quando um linfócito com recetores específicos para um determinado microrganismo patogénico encontra este antígeno, sofre expansão clonal (3).

1.4 Linfócitos T

Os linfócitos T formam-se a partir de precursores linfoides da medula óssea ou do fígado fetal, que migram e se desenvolvem no timo (34). Após a sua maturação, as células T naive saem para a periferia e podem diferenciar-se em células T efectoras.

No sentido de identificar as células do sistema imunitário foi desenvolvido um sistema de categorização das mesmas por intermédio da identificação de proteínas expressas na superfície das células imunes. Assim, o sistema de classificação assenta nas designações das diferentes moléculas categorizadas de acordo com nomenclatura dos *Clusters of Differentiation* (CD).

Com base neste pressuposto as células T podem dividir-se maioritariamente em dois tipos, células T auxiliares ou T *helper* (Th) que se caracterizam pela expressão do co-recetor CD4, e as células T citotóxicas (Tc), que se caracterizam por expressarem o co-recetor CD8 (2).

A ativação celular é rigorosamente regulada para garantir que as células T apenas respondem a antígenos estranhos. Para que tal aconteça, o antígeno é apresentado à célula no contexto de uma molécula do complexo major de histocompatibilidade (MHC – *Major Histocompatibility Complex*).

As moléculas de MHC classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) encontram-se nas células nucleadas e plaquetas e as moléculas de MHC II (HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP) são apenas expressas nas APC (células dendríticas, macrófagos ou células B).

As células T CD8 interagem com células nucleadas e plaquetas (que expressam MHC de

classe I). Por seu lado, as células T CD4 interagem com as células apresentadoras de antígeno (APC), que expressão MHC de classe II (35).

A expressão de MHC I nas células nucleadas, permite que células infetadas com um vírus ou mesmo células que estejam a produzir antígenos tumorais possam ser destruídas pelo ataque citotóxico das células T CD8, ao apresentarem antígenos estranhos nas suas moléculas de MHC de classe I. No caso das células T CD4, a sua ativação leva à produção de citocinas que ativam várias células e funções imunes, desempenhando estas células também um papel importante na ativação do linfócito B (2).

A apresentação de um antígeno estranho pelas APCs (células apresentadoras de antígeno) às células T naive desencadeia a sua ativação iniciando-se a expansão clonal das células ativadas, que por sua vez se vão diferenciando em células efetoras capazes de eliminar o agente patogénico (36). Após a expansão e diferenciação das células naive, acerca de 90 a 95 % da população de células T ativadas acaba por morrer, enquanto 5 a 10% das células se vai diferenciar em diferentes tipos de células T de memória (37). Nos locais infetados podem encontrar-se, após à infeção, células de memória efetoras enquanto as células de memória central tendem a regressar e manter-se nos órgãos linfoides secundários (36).

Uma vez diferenciadas, as células T CD4 ou Th podem dividir-se em diferentes subpopulações de acordo com a produção de diferentes citocinas, reconhecendo-se hoje em dia as células Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Th foliculares (Tfh) e ainda as células T reguladoras (Treg) (38). As células Th1 produzem IL-2 e IFN- γ (diferenciando-se de um estado basal Th0 por ação da IL-12). Pelo contrário, as células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (diferenciadas a partir de Th0 pela ação da IL-4) (39). Mais classicamente as células Th1 regulam a imunidade celular e são caracterizadas pela produção de IFN- γ , enquanto que as células Th2 regulam a imunidade humoral e são caracterizadas pela secreção de IL4. As células Th17, tipicamente associadas a respostas a fungos e também ao desenvolvimento de doenças autoimunes, apresentam caracteristicamente a produção de IL17. Por fim, as mais recentemente identificadas células T reguladoras estão fortemente implicadas nos processos de tolerância e de supressão dos restantes braços da resposta imune. Tipicamente, estas células produzem IL-10 e TGF-beta, sendo reguladas pelo factor de transcrição Foxp3 (40).

As células T Natural Killer (NKT) constituem um subgrupo de linfócitos T cujo TCR reconhece antígenos lipídicos apresentados no contexto da molécula CD1d, uma molécula de MHC de classe I não clássica (41). Estas células podem ainda ser divididas em pelo menos 2 subtipos de acordo com as suas cadeias de TCR (receptor de célula T), as células do tipo I ou NKT invariantes (iNKT), que utilizam cadeias α do TCR invariantes, e as células do tipo II, que expressam diferentes combinações de cadeias TCR (42). Maioritariamente os TCR das células iNKT apresentam as cadeias V α 24-J α 18 / V β 11 (41). As células NKT são identificadas através da expressão de CD16, CD56 e CD161 por parte das células T (43) e através do marcador 6B11 que deteta o CDR3 da cadeia V α 24-J α 18, independentemente da utilização de marcadores para TCR β (44).

1.5 Linfócitos B

Os linfócitos B formam-se na medula óssea, acabando por migrar para o baço ou outros órgãos linfoides secundários após terminarem o período de maturação medular, e são caracterizados pela sua capacidade de produção de anticorpos (45).

Os receptores específicos de antígeno das células B são imunoglobulinas, moléculas constituídas por 2 cadeias pesadas (H) e 2 cadeias leves (L) expressas na superfície celular (46). Na sua estrutura as imunoglobulinas possuem domínios variáveis para ligação ao antígeno (as porções Fab) e domínios constantes com funções efetoras (as porções Fc). De acordo com a respetiva cadeia pesada, distinguem-se 5 classes de imunoglobulinas, concretamente, os isótipos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE (46).

Na medula óssea, as células B passam por diversos estádios de desenvolvimento onde adquirem a sua especificidade antigénica. No seu processo de maturação, as células B imaturas começam por expressar inicialmente IgM, que vai ser inclusivamente o primeiro anticorpo a ser secretado numa resposta imune primária (47). Mesmo que saiam da medula óssea num estadio imaturo, as células B podem completar a sua maturação na periferia, passando a co-expressar em simultâneo IgM e IgD na sua superfície celular, de uma forma independente de antígenos (45). Esta fase de diferenciação em que há co-expressão de IgM e IgD corresponde à fase de célula B naive.

Numa fase subsequente, dependente de antígeno, a célula B vai reconhecer os antígenos pelos seus BCR (IgM e IgD) expressos na superfície celular. Após internalizar o antígeno, este é processado e vai passar a ser expresso nas moléculas de MHC de classe II. A formação deste complexo permite a apresentação do antígeno a um linfócito T, que, por conseguinte, vai ser ativado e produzirá citocinas que funcionarão como fatores de estimulação agora para a célula B. De facto, estas citocinas produzidas pelas células T vão induzir a diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos, os plasmablastos e os plasmócitos (2), podendo também diferenciar-se células B de memória nesta fase. Neste processo de diferenciação B, dependente da interação com a célula T nos órgãos linfoides secundários, é crucial a presença da ligação entre o CD40 da célula B e o seu ligando (CD40L, ou CD154), que é expresso quando ocorre ativação nas células T. Sem esta ligação, não pode ocorrer o fenómeno de *class switch*, troca de isótipo, ficando a célula B apenas capaz de expressar e secretar IgM.

1.6 Citometria de Fluxo

A Citometria de Fluxo é um dos métodos mais importantes de avaliação dos componentes do sistema imunológico. Esta tecnologia permite a utilização de combinações de fluorocromos e marcadores específicos para diferentes populações celulares para a sua identificação (48). De facto, através da Citometria de Fluxo é possível a caracterização de distintas populações e subpopulações celulares específicas, mas também a avaliação da expressão de proteínas específicas e a identificação de alterações imunes relacionadas com a função celular (49,50). Esta técnica permite uma análise multiparamétrica simultânea e rápida de características físicas e químicas de células ou partículas individuais, mantidas em suspensão. Para isso, as partículas em suspensão, organizadas por focagem hidrodinâmica, vão intercalar individualmente um ou mais feixes de luz laser (51), processo pelo qual vai ser possível posteriormente proceder à sua caracterização. Na realidade, a avaliação celular feita na Citometria de Fluxo assenta em 3 sistemas base: o componente fluídico, o componente ótico (de excitação e coleta) e o componente eletrónico. O sistema fluídico direciona as partículas em suspensão no fluxo de fluido para a fonte de luz focalizada; o sistema ótico de excitação foca a fonte de luz nas células enquanto a ótica de coleta transmite assim a luz fluorescente da partícula ao sistema

eletrónico, que por sua vez deteta o sinal e o converte em dados digitais de acordo com a intensidade da luz (52).

Os fluorocromos são utilizados para deteção de proteínas alvos e emitem luz quando excitados por um laser com comprimento de onda de excitação específico de acordo para cada fluorocromo. Mais especificamente, a dispersão da luz ou a emissão de fluorescência através de fluorocromos são medidas por dois detetores óticos: o da Dispersão Frontal ou *Forward Scatter* (FSC), que capta a luz que é dispersada frontalmente, tipicamente até 20° do eixo dos feixes de laser e o da Dispersão Lateral ou *Side Scatter* (SSC) que mede a dispersão da luz num angulo de 90° relativamente ao laser. Em conjunto, estes detetores permitem uma diferenciação genérica de subpopulações celulares dentro de uma população heterogénea. Detalhadamente, o FSC permite a discriminação das células em função do seu tamanho relativo, sendo a intensidade do FSC proporcional ao tamanho relativa da célula e o SSC fornece informações sobre a complexidade celular interna, nomeadamente o conteúdo granular. (53).

A partir desta tecnologia é possível identificar as células do sistema imune com base no sistema mencionado anteriormente, que consiste na designação de diferentes proteínas de superfície ou até mesmo intracelulares que foram sendo identificadas ao longo do tempo e designadas por diferentes números a seguir à sigla CD (*Clusters of differentiation*).

Esta metodologia é atualmente utilizada para todas as células do sistema imune.

Começando pelas células da Imunidade Inata:

As DCs podem ser identificadas pela expressão forte de moléculas de complexo major de histocompatibilidade de classe II, ou seja, por terem expressão forte da molécula HLA-DR, e em simultâneo por serem células negativas para marcadores como o CD3, utilizado para identificar células T, o CD14, específico para monócitos e ainda o CD19 e o CD20, utilizados para identificar células B (54). Estas células podem ainda ser divididas em várias subpopulações celulares, como as DCs de linhagem mielóide (CD11c⁺) ou as DCs de linhagem plasmocitóide (CD123⁺), entre outras (55).

O CD16 é expresso por um subconjunto de monócitos humanos (monócitos CD16⁺) e tem um papel importante na citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC), nomeadamente na ADCC das células NK. E sabe-se que a existência

de polimorfismos nas regiões de Fc γ R afetam a ligação de IgG (56).

Estas células são ainda produtoras de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2 e IFN (interferão)- γ , entre outras (57).

As células NK podem ser subdivididas em duas subpopulações que se encontram em sangue periférico: as células CD16⁺ CD56^{low}, que existem em maior quantidade e as células CD16⁺ CD56^{high} (58).

Também os monócitos podem ser classificados em distintas subpopulações, concretamente de acordo com a expressão de CD14 e CD16, podem identificar-se as subpopulações de monócitos CD14^{high} CD16⁻ e CD14^{low} CD16^{high} (59).

Quanto às células da Imunidade Adaptativa:

Classicamente as células T naïve e as células T de memória são distinguidas através da expressão de diferentes isoformas de CD45: as células T naïve expressam CD45RA enquanto as células T de memória expressam, na sua maioria, CD45RO (60). Esta análise tem vindo a ser complementada por outros marcadores celulares, como o recetor de quimiocinas CCR7, a L-selectina, CD62L, ou o CD27, um membro da superfamília dos recetores do Fator de necrose tumoral.

A expressão de CCR7 e de CD45RA é normalmente utilizada para a distinção dos diferentes subconjuntos de células T, onde nomeadamente as células T naïve são CCR7⁺ CD45RA⁺, as células T de Memória Central são CCR7⁺ CD45RA⁻, as células de Memória Efetora são CCR7⁻ CD45RA⁻ e as células T Efetoras são CCR7⁻ CD45RA⁺ (61). Tal como ilustrado na Figura 1, a partir de um painel de Imunofenotipagem das células T, usando CD3 como marcador pan-T e posteriormente CD4, CD8, CCR7 e CD45RA, para distinguir as respetivas subpopulações celulares, é possível fazer esta análise, sendo ainda possível acrescentar identificação de células Th1, Th2 e Th17, através da expressão de CCR3 e CCR6 (55). No entanto, na avaliação dos perfis de células naïve/memória/efetoras, o marcador CCR7 pode ser facilmente substituído pelos marcadores CD27 ou CD62L (62).

Através da expressão de recetores de quimiocinas como o CXCR3 e o CCR6, tem vindo a ser proposta também a identificação dos perfis de diferenciação de células T, sobretudo Th, sem ser necessária a sua avaliação funcional, isto é, sem ser necessária a avaliação da

produção das citocinas típicas de cada perfil celular. Assim, as células Th1, produtoras de IFN- γ , serão sobretudo células com expressão de CXCR3, as células Th17, produtoras de IL17 terão sobretudo expressão de CCR6, e as células Th2, que não expressam nem CXCR3 nem CCR6, terão pelo contrário expressão de CCR4 (63).

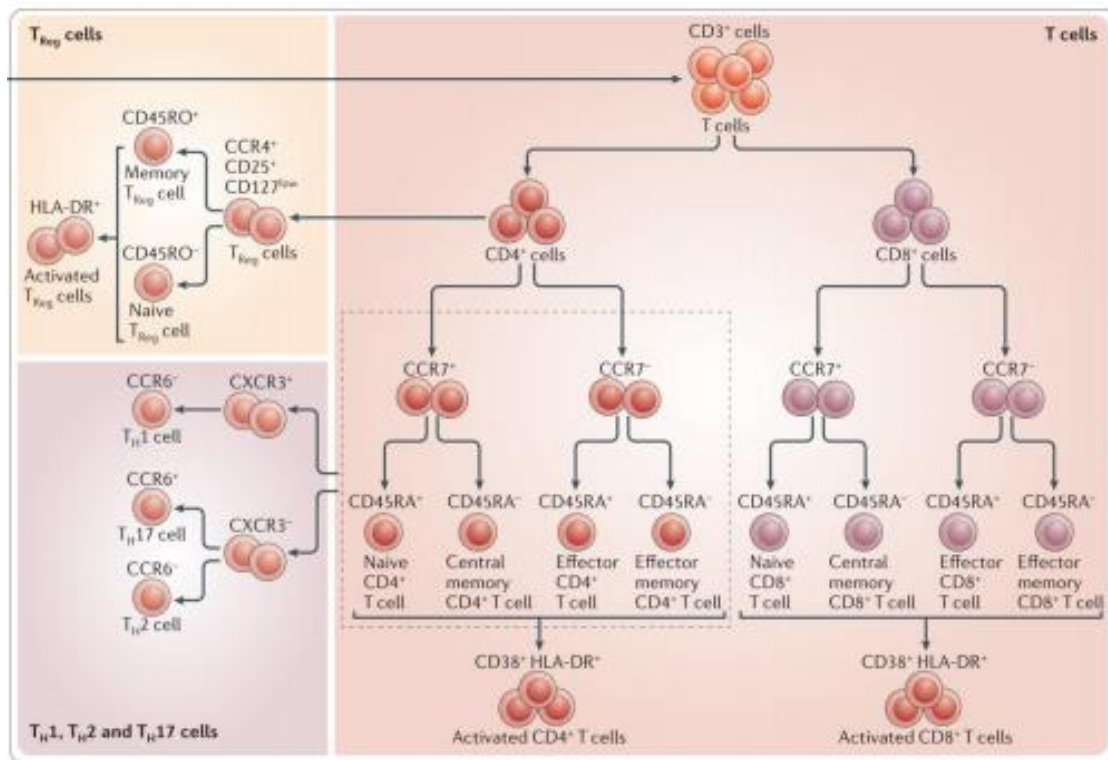


Figura 1: Caracterização das diferentes subpopulações de Células T em função da expressão de distintos marcadores de superfície. Adaptado de Maecker et al (2012) (55)

Classicamente as células B periféricas são classificadas de acordo com a expressão de IgD, IgM e CD27 em células B naive ou pré-centro germinativo (IgD⁺ IgM⁺ CD27⁻) e células B de memória ou pós-centro germinativo (CD27⁺) (64).. Dentro das células de memória distinguem ainda duas subpopulações de acordo com a presença ou não de IgM e IgD, isto é, células B de memória ou pós-centro germinativo sem *switch* (CD27⁺ IgD⁺ IgM⁺) e com *switch* (CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻). Estes marcadores podem assim juntar-se a CD19 e CD20, marcadores típicos de linhagem B, para a caracterização dos estádios de diferenciação da célula B como se representa na Figura 2 (55). A utilização de CD38 e CD24 permite ainda a identificação de plasmablastos e células B de transição.

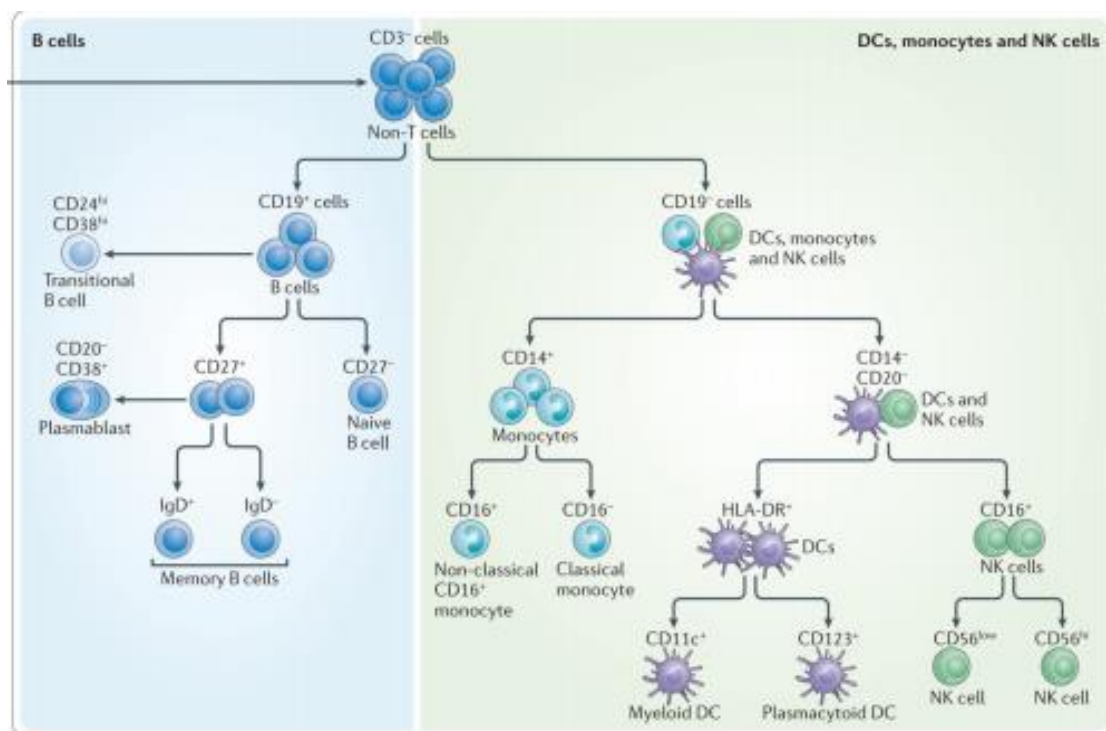


Figura 2: Caracterização das diferentes subpopulações de células B e de Células Dendríticas Plasmacitoides, Monócitos e Células Natural Killer, dentro das células mononucleadas sem expressão de CD3. Adaptado de Maecker et al (2012) (55).

1.7 O Consórcio EuroFlow

O EuroFlow é um consórcio científico que reúne peritos das áreas da Citometria de Fluxo e diagnóstico molecular (cerca de 20 grupos de investigação), que têm como objetivo o desenvolvimento e padronização de testes altamente sensíveis para o diagnóstico e classificação de doenças hematológicas e doenças do foro imune (65). Recentemente, este consórcio desenvolveu para o estudo de Imunodeficiências Primárias (PID), através de um conjunto de métodos e ferramentas padronizadas, o kit Primary Immunodeficiency Orientation Tube (PIDOT) que permite uma avaliação de várias populações celulares que estão implicadas em vários tipos de PIDs, sobretudo relacionadas com defeitos na linhagem linfóide, tal como é ilustrado na Figura 3. Dentro deste consórcio, a Cytognos S.L. desenvolveu o Software Infinicyt™ que fornece uma abordagem rápida e fácil para a interpretação de grandes conjuntos de dados num único arquivo. Este Software foi assim projetado para utilizar em combinação com os painéis de anticorpos EuroFlow de 8 cores desenvolvidos para o apoio ao diagnóstico e classificação de PID's (66).

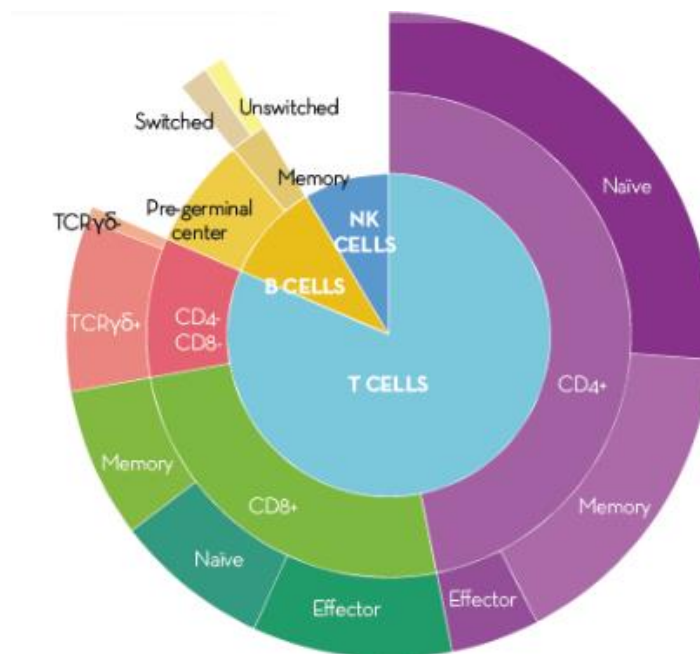


Figura 3: Imagem ilustrativa das populações e subpopulações celulares possíveis de caracterizar através do PIDOT dentro do compartimento linfóide de sangue periférico. Adaptado de www.cytoqnos.com

1.8 Drepanocitose

A Drepanocitose ou Doença das Células Falciformes (DCF), também chamada de Anemia Falciforme é uma hemoglobinopatia particularmente comum em indivíduos oriundos de regiões da África Subsariana, Índia, Arábia Saudita e alguns países do Mediterrâneo. A sua frequência no continente americano deve-se sobretudo a eventos migratórios (67).

Em 1910, em Chicago, o médico cardiologista James Herrick descreveu pela primeira o tipo de alteração que é característico das hemácias da doença. Herrick observou estas alterações num estudante de Grenada, que apresentava queixas a nível cardíaco, palpitações, falta de ar, febre e tosse. Dos vários exames efetuados ao doente, a avaliação dos elementos sanguíneos chamou a atenção pela identificação de um grande número de hemácias falciformes (68).

A Anemia Falciforme é uma das doenças monogénicas mais comuns (69). Deriva de uma mutação no gene da beta (β) hemoglobina, causada por uma substituição da base nitrogenada timina por adenina, que conduz à substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, na posição 6 da cadeia β . Assim, nesta hemoglobinopatia, a molécula normal

de hemoglobina (HbA) sofre alteração e apresenta-se sob a forma de hemoglobina S (HbS) (70,71). O genótipo mais comum desta doença é a homozigotia para a HbS, sendo esta também a forma mais grave da doença. Entre as formas menos comuns incluem-se a heterozigotia para HbS com β -talassemia (HbS/ β talassemia) e a heterozigotia para HbS com hemoglobina C (HbSC) (72).

Quando a HbS sofre o processo de desoxigenação, gera-se uma interação hidrofóbica com outra molécula de hemoglobina, o que por sua vez desencadeia uma agregação em grandes polímeros. Essa polimerização, induzida pela desoxigenação, provoca a distorção da forma da célula e diminui significativamente a sua capacidade de deformação. Assim, geram-se células de alta rigidez, que entre outras coisas, são responsáveis pela ocorrência de crises vaso-oclusivas, dolorosas e típicas da doença (73). De facto, é capacidade de deformação permanente dos eritrócitos que garante a sua normal passagem pelos canais vasculares. O processo de polimerização é responsável pela forma falciforme ou “em banana” das células, que se associa a um aumento não seletivo na permeabilidade dos catiões de membrana ao sódio, potássio, magnésio e cálcio. Estes catiões ao entrarem nos glóbulos vermelhos ativam vários sistemas de transporte de membrana, o que leva à desidratação das células que, por sua vez, aumentam a concentração de hemoglobina, acelerando assim a polimerização durante os próximos episódios de desoxigenação (74).

Do ponto de vista laboratorial, o diagnóstico da DCF é feito através de técnicas como a eletroforese da hemoglobina ou técnicas cromatográficas, como a Cromatografia líquida de alta eficiência (*High-performance liquid chromatography* – HPLC). Para além destas técnicas, mais frequentes, também a espectrometria de massa e a análise de DNA permitem uma avaliação mais completa no estudo desta hemoglobinopatia (75)

1.9 Crises vaso-oclusivas

Fruto da diminuição da capacidade de deformação celular, ocorre nos doentes com DCF o aprisionamento de leucócitos e eritrócitos nos pequenos vasos, o que causa obstrução vascular e isquemia tecidual, levando à ocorrência das crises vaso-oclusivas (76). Na realidade, tem sido evidenciada a existência de um número aumentado de leucócitos aderentes em indivíduos com crise quando comparados com indivíduos saudáveis

(77,78). Sabe-se ainda que, nos doentes com DCF, os monócitos podem ativar nas células endoteliais a via do fator nuclear κB (NF- κB), que por sua vez leva a uma maior expressão de moléculas de adesão como é o caso da E-selectina, da molécula de adesão intercelular (ICAM)-1 e da molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1. Este processo leva a um consequente aumento da adesão de leucócitos às células endoteliais (79).

Estas crises vaso-oclusivas, que provocam dor aguda, são uma das principais complicações que ocorrem em doentes com DCF e são um dos motivos mais frequentes de hospitalização em crianças e adultos, sendo que o aumento da frequência da dor está associado à morte precoce em indivíduos com mais de 20 anos (80).

1.10 Síndrome torácica aguda

As crises vaso-oclusivas nos doentes com DCF precedem frequentemente a ocorrência de síndrome torácica aguda (STA) (76). A STA é, por conseguinte, a segunda causa mais comum de hospitalização em doentes com DCF e uma das principais causas de internamento em unidades de terapia intensiva e de morte prematura (81).

Esta síndrome é uma forma de lesão pulmonar caracterizada pelo desenvolvimento de um infiltrado pulmonar alveolar acompanhado por dor no peito, febre, taquipneia ou tosse (82) e é desencadeada principalmente por situações como infeção pulmonar, embolização do conteúdo da medula óssea e pelo sequestro pulmonar intravascular de eritrócitos falciformes (83). A etiologia mais frequentemente associada a ocorrência de STA em crianças pequenas é a infeção viral (84, 85). Contudo a STA pode também ser causada por embolia gordurosa, pois durante uma crise vaso-oclusiva a vaso-oclusão pode levar à necrose da medula óssea que leva à libertação de êmbolos gordurosos e que por sua vez entram na circulação e podem-se alojar nos pulmões causando assim episódios de hipoxia aguda (86).

Esta patologia nos doentes drepanocíticos está inversamente ligada à idade, com uma maior prevalência na idade infantil (87). Os pacientes internados com crises dolorosas devem ser considerados como um possível início de STA, para além do mais esta patologia pode desenvolver-se em períodos pós-cirúrgicos especialmente em pacientes que não sofreram transfusão sanguínea (88). A DCF homozigótica é a forma mais comum

e a mais grave, contudo, a STA pode ser grave independentemente do genótipo da doença, com taxas de morte por evento semelhantes entre HbSS e HbSC, pelo que todos os doentes devem ser tratados agressivamente (89).

1.11 Disfunção esplénica

A disfunção do sistema imunológico é outra característica que tem vindo a ser associada aos doentes com Drepanocitose (90) e a maioria das alterações imunes estão associadas à disfunção esplénica (91).

O baço é um órgão linfoide secundário e funciona como um filtro do sangue, que ativa e estabelece ligação entre as respostas imunes inatas e adaptativas (92). É capaz de filtrar por minuto 5% do débito cardíaco (93). Nos doentes com DCF, a perda da função esplénica surge maioritariamente na idade infantil, nomeadamente nos primeiros 2 anos de vida, em que ocorre asplenia funcional, observando-se por volta dos 10 anos de idade a ocorrência de auto-esplenectomia fibrótica (94).

O baço, nomeadamente a sua polpa vermelha, desempenha um papel fundamental na defesa contra microrganismos bacterianos pois combina mecanismos de eliminação destes microrganismos através da presença de macrófagos, que reconhecem e fagocitam estes patogénios, mas também através da manutenção de uma população de células B de memória IgM que produzem anticorpos naturais (95,96). O fenótipo destas células, habitualmente chamadas de células B da zona marginal, é CD27⁺ IgM^{high} IgD^{low} (97). A alteração do normal funcionamento do baço leva à redução da capacidade de eliminação de microrganismos em circulação pelos macrófagos da polpa vermelha (92). A função esplénica reduzida e a opsonização deficiente têm vindo a ser apontadas como causas primárias para o desenvolvimento de infeções em crianças com DCF (98). Em concreto, estas crianças são mais suscetíveis a infeções por organismos encapsulados que expressam antigénios polissacarídeos. De facto, estima-se que estes doentes tenham um risco cerca de 600 vezes mais elevado de desenvolver doença pneumocócica invasiva do que indivíduos saudáveis (99).

Além das disfunções do baço serem consideradas como a principal causa do desregulação imune nos doentes drepanocíticos, estima-se que a própria condição da doença seja por

si só uma condição pró-inflamatória em que ocorrem respostas imunes exageradas (100). As infecções bacterianas, quando não tratadas, são a principal causa de morbidade e mortalidade nos doentes drepanocíticos (101).

1.12 Alterações imunes em DCF

Têm vindo a ser descritas alterações em diversos elementos da resposta imunológica em doentes com DCF.

Quando comparados com controlos saudáveis, os doentes drepanocíticos, parecem apresentar contagens mais elevadas de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos (90,102–104), mas também níveis séricos mais elevados de IFN-gama e HbF (102). Relativamente ao total de leucócitos, estes doentes apresentam também percentagens aumentadas de neutrófilos e monócitos e esses aumentos causam uma possível diminuição proporcional na percentagem do total de linfócitos (apesar do aumento na contagem absoluta) (90).

Olhando particularmente para o compartimento T circulante, observaram-se, nestes doentes, percentagens menores de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em relação aos valores encontrados em controlos saudáveis. Por outro lado, a subpopulação de células T CD4⁺ de Memória Central apresentaram percentagens mais elevadas em doentes com DCF, quando comparados com controlos saudáveis (105,106). No entanto, no que se refere aos valores absolutos, quer as células T CD4⁺ quer as células T CD8⁺ parecem apresentar valores iguais ou mais elevados em doentes com DCF, quando comparados com controlos saudáveis (106,107).

Do ponto de vista funcional, a secreção de citocinas de resposta Th1, como o IFN- γ e a IL-2 parece estar diminuída em doentes com DCF quando comparados com indivíduos saudáveis, o que indica uma diminuição da resposta Th1 nos doentes (105). Por outro lado, observou-se um aumento da resposta Th2, comprovado por um aumento da secreção de IL-4, em doentes com DCF que apresentam crises vaso-oclusivas (104,107).

Aprofundando a avaliação do perfil citocínico em doentes com DCF, está descrito que doentes que apresentam crises vaso-oclusivas evidenciam também níveis mais baixos de IL-10 quando comparados com doentes com um quadro clínico mais estável, ao contrário

do que acontece com a IL-4 que nos doentes com crises vaso-oclusivas apresenta níveis séricos mais elevados em comparação a doentes sem crises e indivíduos saudáveis (107). É interessante salientar que uma diminuição gradual na secreção de IL-10 parece ser acompanhada por um aumento do número de episódios vaso-oclusivos e um aumento na severidade da dor (108). Por outro lado, foram também reportados níveis sérios mais elevados de TNF- α e de IL-8 em doentes com DCF quando comparados a indivíduos saudáveis (109).

Reconhecendo o potencial das células iNKT enquanto células produtoras de citocinas pró-inflamatórias, assume-se que estas células possam ser de grande importância na patogénese de crises vaso-oclusivas (110). De facto, quando comparados com controlos saudáveis, as células iNKT no sangue de doentes com DCF encontram-se aumentadas em número absoluto, tendo revelado também aumento nos seus níveis de ativação (111,112).

Como referido anteriormente, os doentes com DCF sofrem normalmente de asplenia funcional (113) e quando comparados com controlos saudáveis, doentes com hiposplenia ou asplenia apresentam níveis reduzidos de células B de memória IgM (CD27⁺IgM^{high}IgD^{low}) (114). Relativamente ao comportamento das células B, observou-se uma redução da resposta proliferativa destas células específicas de antigénio, nomeadamente diminuição na secreção de IgM em doentes com Drepanocitose (115).

Ainda em relação aos componentes humorais da resposta imune, nos doentes com DCF estima-se que haja um défice de imunoglobulinas específicas para o *Streptococcus pneumoniae*, o que por sua vez, causa limitações na opsonização e fagocitose desses microrganismos patogénicos (116). Por outro lado, em relação ao sistema do complemento, níveis baixos do fator B parecem estar diretamente associados a um mau funcionamento da via alternativa em doentes com DCF (117). Existem também algumas associações entre os polimorfismos da MBL2 e as crises vaso-oclusivas nos doentes drepanocíticos (118). A baixa produção de níveis séricos de MBL está associada à frequência de eventos vaso-oclusivos em indivíduos com Anemia Falciforme (119). Há evidência de que a deficiência nesta proteína pode constituir um fator de risco no desenvolvimento de infeções (120) e estudos realizados verificaram associações entre variantes de MBL2 e eventos vaso-oclusivos em populações com Anemia de Células Falciformes no Brasil, contudo a relação entre esta proteína e o desenvolvimento de STA

em doentes com DCF, está ainda por esclarecer (121,122). A função biológica da MBL tem sido alvo preferencial de investigação relacionado com infeções, e é aceite que níveis baixos desta proteína (<500ng/ml) estão associados a maior risco de infeções recorrentes ou de maior gravidade na criança e no adulto. (123)

A molécula de CD40 faz parte da família de recetores do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o seu recetor, o CD40 ligando (CD40L) é expresso sobretudo em células T CD4⁺ ativadas (124). Em doenças que envolvem inflamação vascular os níveis de CD40L solúvel (sCD40L) encontram-se aumentados (125), tendo vindo a comprovar-se que em doentes com DCF também se encontram níveis aumentados de sCD40L (126). Foi também provada na literatura uma associação entre a expressão de CD40L e a frequência de episódios dolorosos em doentes com DCF (127).

Os níveis de Hemoglobina Fetal (HbF) estão clinicamente associados a benefícios nos doentes com Drepanocitose, nomeadamente à sobrevivência dos indivíduos (81). Estes doentes apresentam níveis mais altos de HbF em comparação com indivíduos saudáveis (128).

A hidroxiureia (HU) devido à sua eficiência e aos baixos efeitos tóxicos foi escolhida para estudos da doença Anemia Falciforme (129). Os maiores benefícios deste tratamento são atribuídos à capacidade de aumentar a concentração de HbF (130). O tratamento com este medicamento também reduz a expressão de moléculas de adesão em eritrócitos falciformes, como o VLA-4 e CD36, relacionando-se assim uma redução na expressão do recetor de adesão com uma consequente redução da severidade da doença (131,132). Doentes com terapêutica de HU instituída apresentam níveis séricos menores de TNF- α e níveis séricos mais elevados de IL-10 quando comparados com doentes sem a terapêutica instituída (109). A instituição da terapêutica nos doentes leva à diminuição comprovada de leucócitos (133–135) e reduções a nível das contagens de linfócitos (90,136).

Apesar do acima exposto, os dados da literatura são escassos no que se refere à caracterização imune dos doentes com Drepanocitose, sobretudo no que se refere à caracterização de subpopulações celulares mais específicas. Assim, parece-nos pertinente

completar este conhecimento, bem como perceber de que modo o perfil imune se relaciona com a ocorrência de crises vaso-oclusivas e mais especificamente com a ocorrência de STA. Por outro lado, é ainda importante ter uma melhor compreensão das possíveis implicações do ponto de vista imunológico das estratégias terapêuticas a que estes doentes são submetidos.

1.13 Objetivos

Partindo da abordagem de uma população pediátrica de doentes com diagnóstico de Drepanocitose, este estudo tem como objetivos principais:

- 1) Caracterizar o perfil imune da população pediátrica de doentes drepanocíticos acompanhados no Hospital D. Estefânia – CHLC, nomeadamente a abordagem particularizada das subpopulações de células B, T, NKT e de mediadores solúveis como a MBL e o CD40L;
- 2) Determinar a incidência de Síndrome Torácico Agudo na população pediátrica de doentes drepanocíticos, e avaliar de que forma se relaciona com os dados laboratoriais do perfil imune estudado;
- 3) Avaliar de que forma a terapêutica instituída se relaciona com os dados laboratoriais do perfil imune estudado na população pediátrica de doentes drepanocíticos;
- 4) Relacionar os parâmetros imunológicos com a ocorrência de episódios de Síndrome torácico agudo.

2. Material e Métodos

2.1 População-alvo

Para este estudo foram recrutados, ao longo do ano de 2018, doentes da consulta de Hematologia, do Hospital D. Estefânia – Centro Hospitalar de Lisboa Central (CHLC), com diagnóstico estabelecido de Drepanocitose e idade compreendida entre os 4 e os 17 anos.

Foram estabelecidos como critérios de exclusão a presença de patologia pulmonar crónica concomitante (nomeadamente asma e fibrose quística) e/ou imunodeficiências secundárias, nomeadamente infeção por VIH ou terapêutica com imunossuppressores por qualquer outro motivo.

Para recolha de informação clínica relevante, foram elaborados questionários específicos. Resumidamente, os questionários abrangiam os seguintes pontos:

- Antecedentes Pessoais: contemplando o registo de dados antropométricos (idade, idade de diagnóstico, genótipo);
- Dados clínicos: ocorrência de síndrome torácica aguda (STA), ocorrência de episódios vaso-oclusivos, percentagem de HbF, e terapêutica instituída.

2.2 Ética e Confidencialidade

A todos os doentes e aos seus representantes legais foi entregue um documento com informação genérica sobre o projeto, nomeadamente os seus objetivos e o desenho do estudo, que foi acompanhado por um formulário de consentimento informado. Antes de serem incluídos no estudo, todos os representantes dos doentes assinaram o respetivo consentimento informado, de forma livre e voluntária, confirmando a aceitação da participação do seu representado. Foram igualmente informados de que poderiam abandonar o estudo em qualquer altura, sem qualquer prejuízo para o seu seguimento clínico. A cada participante no estudo foi atribuído um código interno do projeto, com o qual as amostras foram identificadas e posteriormente tratadas, de forma a proteger a privacidade de cada participante, e maximizar a confidencialidade dos dados e resultados

obtidos. O Comissão de Ética para a Saúde do Hospital D. Estefânia - CHLC (processo 606/2018) aprovou o protocolo do estudo, bem como a Comissão de Ética da NOVA Medical School|Faculdade de Ciências Médicas (NMS|FCM) da Universidade Nova de Lisboa (processo nº 08/2018/CEFCM) e todas as investigações foram realizadas seguindo as linhas de orientação da Declaração de Helsínquia (137).

2.3 Obtenção das amostras

A cada doente foram realizadas colheitas do sangue periférico (aproximadamente 7ml), no Hospital D. Estefânia. As amostras foram colhidas em tubos de EDTA (anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético) para posterior análise de populações celulares por Citometria de Fluxo, e em tubos secos, sem anticoagulante, para posterior análise das proteínas séricas, Lectina de ligação à manose (MBL – *Mannose-Binding lectin*) e CD40L.

Os amostras colhidas foram transportadas no próprio dia da colheita para o laboratório de Imunologia da NMS|FCM. Para a avaliação celular imunofenotípica todas as amostras foram processadas até 24 horas após a respetiva colheita. Para a avaliação serológica procedeu-se à centrifugação das amostras colhidas em tubo seco durante 10 minutos a 540g, tendo sido feita a separação do soro para tubos de criopreservação. As alíquotas de soro dos doentes foram armazenadas a -20°C até à sua avaliação. Para a avaliação serológica foram utilizados soros controlo do Laboratório de Imunologia da NMS|FCM, obtidos a partir de uma população pediátrica do Hospital D. Estefânia sem patologia imune associada, igualmente conservados a -20°C em criotubos.

2.4 Processamento das amostras para análise celular

2.4.1 Citometria de fluxo

A principal técnica utilizada neste estudo foi a Citometria de Fluxo. Em concreto, foi utilizado o Citómetro de Fluxo BD FACSCanto™ II, equipado com 3 lasers, nomeadamente um laser azul de emissão nos 488 nm, um laser vermelho de emissão nos 633 nm e um laser violeta de emissão nos 405 nm, permitindo assim uma deteção

simultânea de 8 fluorescências distintas. Esta técnica foi utilizada na análise das várias populações celulares, mas também na quantificação de mediadores solúveis (CD40L).

2.4.2 Imunofenotipagem Celular

Para a imunofenotipagem celular foram considerados 3 protocolos distintos: uma avaliação inicial em plataforma única para quantificação das células em valor absoluto (células/ μ l); uma avaliação com kit comercial PIDOT, usado para caracterização genérica de subpopulações celulares usadas no diagnóstico de imunodeficiências primárias e uma avaliação posterior do perfil de diferenciação de células T e NKT, usando um painel de anticorpos monoclonais de 2 tubos, previamente validado.

2.4.3 Quantificação celular

Para a obtenção de contagens absolutas (células/ μ l) em todos os protocolos de imunofenotipagem celular, utilizou-se uma estratégia inicial de plataforma única. Para cada amostra foi marcado um tubo TruCount (BD TruCount Tubes – Ref. 340334, BD Biosciences), no qual foram pipetados 5 μ l de CD45 PerCP (Ref. 345809, clone 2D1, BD Biosciences) e 50 μ l de sangue do respetivo doente. A mistura foi depois homogeneizada cerca de 2 a 3 segundos por vortexação, e incubada durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação juntaram-se 450 μ l de solução BD FACS Lysing (Ref. 349202, BD Biosciences), fez-se nova agitação por vortexação e nova incubação de 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. No final desse tempo, as células foram adquiridas de imediato no citómetro e procedeu-se à contagem absoluta de leucócitos (WBC – *White Blood Cells*).

2.4.4 PIDOT- *Primary Immunodeficiency Orientation Tube*

O principal kit utilizado neste estudo foi o PIDOT- *Primary Immunodeficiency Orientation Tube* (138) projetado juntamente com um conjunto de métodos e ferramentas totalmente padronizados pelo consórcio EuroFlow para o estudo de Imunodeficiências Primárias. O kit contém uma mistura de anticorpos liofilizados, conjugados com distintas fluorescências, projetada para a triagem de imunodeficiências primárias por Citometria de Fluxo.

O protocolo laboratorial iniciou-se com a preparação das soluções de trabalho, incluindo a solução *Bulk lysis* (incluída no kit), em que se fez uma diluição de 1/10 em água destilada à temperatura ambiente. Esta solução de trabalho (1X) é estável durante 1 mês quando preservada a 4°C.

A solução de lavagem inicialmente encontra-se a 30% e foi preparada para ficar a 0,5 % (PBS + 0,09% (m/v) NaN₃ + 0,5 % (m/v) BSA]. Para tal juntaram-se 16.7ml de BSA a 983,3ml de PBS.

De seguida, procedeu-se à reconstituição da mistura de anticorpos liofilizada, incluída também no kit, e que contem os seguintes anticorpos:

- IgD/CD8-FITC, clone: IADB6/UCHT-4, isotype: IgG2a/IgG2a
- CD16/CD56-PE, clone: 3G8/C5.9, isotype: IgG1/IgG2b
- CD4/IgM-PerCP-Cyanine5.5, clone: RPA-T4/MHM-88, isotype: IgG1 /IgG1
- CD19/TCR $\gamma\delta$ -PE-Cyanine7, clone: 19-1/TCR-1, isotype: IgG1/IgG1
- CD3-APC, clone: UCHT-1, isotype: IgG1
- CD45-APC-C750, clone: HI30, isotype: IgG1.

Cada mistura liofilizada foi reconstituída com 300 μ l de água destilada, e agitada durante 30 minutos antes de utilizar (em agitador com velocidade de rotação de 150 rotações/minuto). Esta mistura é estável durante 4 semanas quando preservada a 4°C.

Em conjunto com os anticorpos monoclonais do kit, em cada amostra foram também incluídos os anticorpos monoclonais abaixo, como recomendado pelo fabricante:

- CD45RA-BV510, clone: HI100 (Ref: 563031, BD Biosciences),
- CD27-BV421, clone: M-T271 (Ref: 562513, BD Biosciences).

No processamento de cada amostra, após se efetuar o protocolo de quantificação inicial, para obtenção das contagens absolutas de leucócitos, deu-se início à técnica de *Bulk lysis* de acordo com as recomendações do fabricante. Em suma, pipetaram-se 1.5 ml (se amostra com WBC $>8 \times 10^6$ células/ml) ou 2.0 ml (se amostra com WBC $<8 \times 10^6$ células/ml) de sangue total de cada amostra num tubo FALCON de 50ml e perfizeram-se

os 50ml com solução *Bulk Lysis* (1X), previamente preparada. Após uma breve agitação inicial, seguiu-se uma incubação de 15 minutos em agitador com velocidade de 150 rotações/minuto. Foi depois efetuada uma centrifugação de 10 minutos a 800g e retirou-se o sobrenadante com pipeta de Pasteur sem perturbar o *pellet*, deixando-se cerca de 300µl de suspensão celular no fundo do tubo. De seguida, adicionaram-se 2ml de solução de PBS + 0,09% (m/v) NaN₃ + 0,5 % (m/v) BSA (i.e. solução de lavagem) e ressuspendeu-se o *pellet* vigorosamente. Perfez-se um volume de 50ml com solução de lavagem e centrifugou-se novamente o tubo durante 5 minutos a 800g. Foi então removido o sobrenadante sem perturbar o *pellet*. De seguida, ressuspendeu-se o *pellet* em 2ml da solução de lavagem anteriormente usada e transferiu-se para um tubo FACS de 5ml, tendo-se recuperado ainda as células residuais do tubo de FALCON inicial com mais 2ml da solução de lavagem. Centrifugou-se o tubo FACS com o volume total do *pellet* ressuspendido durante 5 minutos a 540g e removeu-se o sobrenadante. Manteve-se com o *pellet* ressuspendido num volume residual de aproximadamente 300µl de solução de lavagem.

Posteriormente, procedeu-se à leitura da concentração celular num contador de células TC20 (BioRad). De forma a poderem encontrar-se na gama de leitura do equipamento, foram preparadas diluições de 1/10 e 1/100 da suspensão celular. De seguida, a partir de cada suspensão celular diluída, foram pipetados 10µl na zona de aplicação de uma lâmina de leitura e procedeu-se à respetiva leitura no TC20. De acordo com a contagem obtida, foi ajustada a concentração da suspensão celular inicial para um valor entre 0.5 e 1x10⁵ células/µl, com a solução de lavagem.

Procedeu-se ao protocolo de marcação celular. Num tubo FACS foram pipetados 50µl da mistura de anticorpos do kit, 25µl da suspensão celular com concentração ajustada, e ainda 1µl de CD27-BV421 e 2,5µl de CD45RA-BV510. Homogeneizou-se a preparação e perfizeram-se os 100µl com PBS + 0,09% (m/v) NaN₃ + 0,5 % (m/v) BSA. Foram então incubadas as células durante 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. No final da incubação adicionaram-se 2 ml de solução *BD FACS lysing*, fez-se uma homogeneização vigorosa e foram novamente incubadas as células durante 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação de 5 minutos a 540g e de seguida descartou-se o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur sem perturbar o *pellet*,

deixando cerca de 100µl de volume residual. Adicionaram-se 2ml de solução de lavagem ao *pellet* e centrifugou-se novamente durante 5 minutos a 540g. O sobrenadante foi descartado deixando aproximadamente 100µl e ressuspendeu-se o *pellet* em 150-200µl de PBS + 0,5 % (m/v) BSA. As células foram adquiridas de imediato no citómetro, usando o software BD FACS Diva, procedendo-se a uma leitura de pelo menos 1 000 000 de células por tubo.

2.4.5 Caracterização dos perfis de diferenciação T e NKT

O painel de caracterização dos perfis de diferenciação T e NKT incluiu os seguintes anticorpos monoclonais:

Tabela 1: Anticorpos monoclonais usados no painel de caracterização dos perfis de diferenciação de células T e NKT

Anticorpo	Clone	Fluorescência	Fabricante
6B11	6B11	FITC	BD Biosciences
6B11	6B11	PE	BD Biosciences
CCR6	11A9	Alexa 647	BD Biosciences
CD3	SK7	PerCP	BD Biosciences
CD4	SK3	APC	BD Biosciences
CD8	SK1	PE CY7	Biolegend
CD161	DX12	PE	BD Biosciences
CXCR3	1C6/CXCR3	Alexa 488	BD Biosciences

Os anticorpos monoclonais foram distribuídos em 2 tubos, tal como se indica abaixo, referindo-se igualmente o volume (em µl) usado em cada tubo.

Tubo 1: CXCR3 Alexa488 (5) / 6B11 PE (10) / CCR6 Alexa647 (5) / CD3 PerCP (2,5) / CD8 PeCy7 (2,5)

Tubo 2: 6B11 FITC (10) / CD161 PE(10) / CD4 APC(1) / CD3 PerCP (2,5) / CD8 PeCy7 (2,5)

Ao tubo 1 adicionaram-se 100µl de sangue total e ao tubo 2 adicionaram-se 25µl de suspensão celular resultante da técnica anterior (PIDOT / *Bulk lysis*). Inicialmente, tentou utilizar-se em ambos os tubos a suspensão celular obtida com a técnica anterior, uma vez que permite concentrar e aumentar a rentabilidade do número de células adquiridas, o que

seria uma mais valia sobretudo para populações raras como as células NKT. No entanto, foi identificada uma interferência da técnica de *Bulk lysis* nos anticorpos anti-recetores de quimiocinas usados no tubo 1 (139), pelo que neste caso se procedeu à marcação direta de sangue total.

De forma igual para os 2 tubos, fez-se uma incubação das células com os anticorpos monoclonais durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. De seguida, adicionaram-se 2ml de solução de lise BD FACS Lysing, e incubaram-se novamente os tubos durante 10 minutos nas mesmas condições. Procedeu-se, então, a uma centrifugação dos tubos durante 5 minutos a 280g, após a qual se fez a rejeição dos sobrenadantes por inversão. Finalmente, juntaram-se 2ml de BD FACS Flow (BD Biosciences), centrifugaram-se novamente os tubos durante 5 minutos a 280g, fez-se a rejeição dos sobrenadantes por inversão, e ressuspenderam-se os *pellets* com 300µl de BD Cell fix (BD Biosciences). Foram de imediato adquiridas as amostras no citómetro, tendo sido adquiridas no mínimo 200 000 e 500 000 células, respetivamente nos tubos 1 e 2.

2.5 Análise dos ficheiros

As amostras adquiridas foram analisadas com o Software Infocyt™ 2.0, usando-se também sempre que aplicável a base de dados Euroflow Database Connector.

Para a quantificação celular foi usada, como anteriormente referido, uma estratégia de plataforma única. Assim, para cada população ou subpopulação celular os resultados foram obtidos como percentagens (em relação à celularidade total e/ou em relação a uma população-mãe, definidas de forma idêntica para todas as amostras analisadas), e também como contagens absolutas (células/µl), derivadas direta ou indiretamente das contagens obtidas no protocolo inicial, com recurso aos tubos Trucount™ com esferas calibradas.

A Figura 4 representa a estratégia de análise da população de esferas calibradas e das populações de leucócitos, usadas para a obtenção das contagens absolutas de leucócitos e linfócitos.

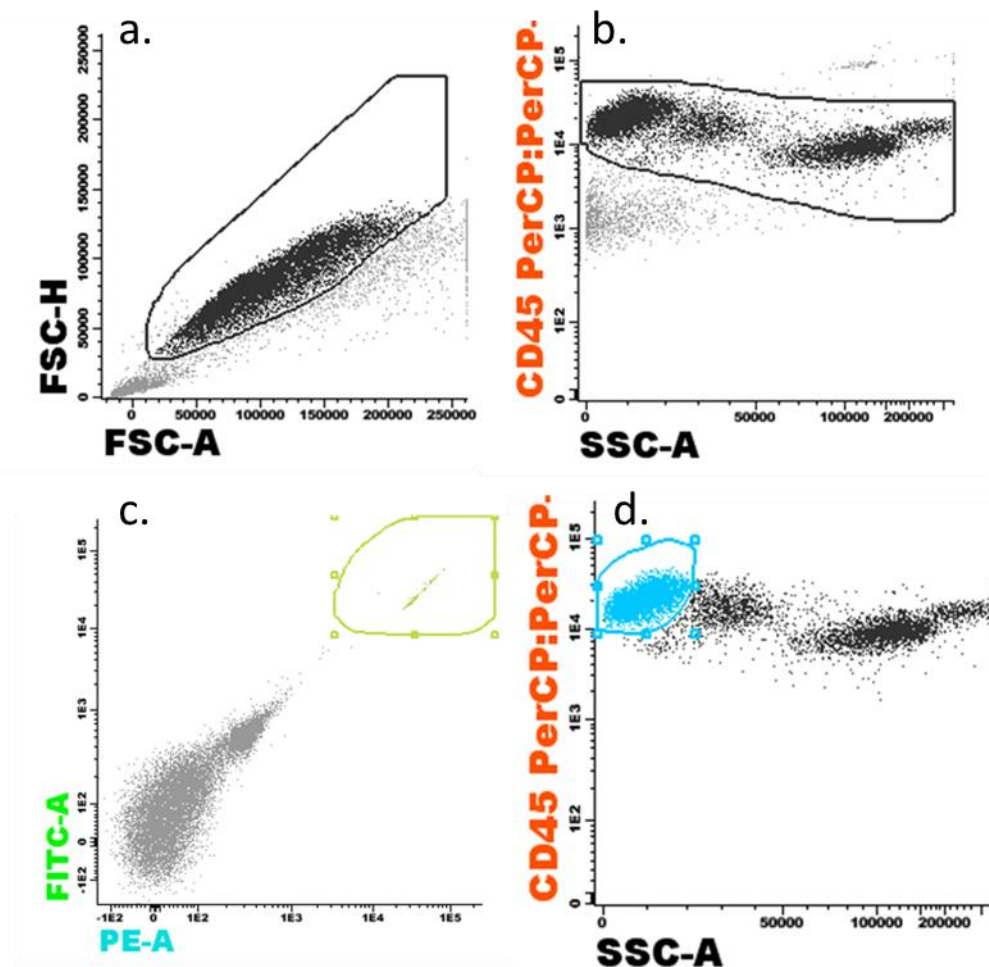


Figura 4: a. e b. Estratégia de análise para identificação de leucócitos, a negro (células CD45+dentro da população de singletos isolados em a.). c. Identificação da população de esferas, a verde, a partir dos seus níveis de autofluorescência elevados em FITC e PE. d. Identificação da população de linfócitos (CD45+ SSClo), azul turquesa, dentro da população de leucócitos. SSC – Side Scatter

A fórmula utilizada para a obtenção das contagens absolutas foi a abaixo exposta,

$$\text{Valor absoluto WBC (cels/}\mu\text{l)} = \frac{\text{n.º WBC adquiridos}}{\text{n.º de esferas adquiridas}} \times \frac{\text{esferas por tubo}}{\text{volume de amostra}}$$

em que o número de esferas por tubo, é um valor dependente do lote de tubos Trucount™, próximo de 50 000, e o volume de amostra corresponde ao volume total de sangue pipetado por tubo.

Em relação aos ficheiros referentes ao tubo PIDOT, a sua análise implicou a sua passagem pela Base de Dados EuroFlow. Salienta-se que o recurso a esta base de dados implica a

adoção das estratégias de harmonização e controlo de qualidade recomendadas pelo consórcio Euroflow, de forma a tornar possível a harmonização das imagens como descrito neste trabalho. Estes protocolos foram seguidos no âmbito da rotina laboratorial do Laboratório de Imunologia de NMS|FCM. Desta forma, após a passagem dos ficheiros pela base de dados, a generalidade das células é identificada na respetiva população a que pertence, mediante a sua análise do seu perfil em todos os parâmetros considerados pela estratégia, com apenas uma percentagem residual de células a precisar de verificação pelo operador (aproximadamente <5% do total de células adquiridas). São adicionadas ainda à base de dados, para posterior interpretação, a idade do respetivo doente (em anos e meses) e as contagens absolutas obtidas na análise do tubo da quantificação acima descrita.

Nas figuras 5 a 9 são apresentadas imagens exemplificativas da análise celular, obtidas com o Software Infinicyt, após a passagem pela respetiva Base de Dados EuroFlow. A Figura 4 refere-se à avaliação das populações de leucócitos consideradas. Na Figura 5, esquematiza-se a identificação das subpopulações de linfócitos avaliados: células T, células B e células NK. Depois, as figuras 6, 7, 8 e 9 referem-se às subpopulações de linfócitos T e B, evidenciando especificamente a sua divisão do ponto de vista da diferenciação celular. Isto é, para as células T, CD4 e CD8, as células foram caracterizadas em função da expressão de CD27 e CD45RA, distinguindo-se as subpopulações de células naive, de memória central, de memória efetoras e efetoras com diferenciação terminal, dentro das células T CD4 (Figura 7), e as subpopulações de células naive, de memória central, de memória efetoras e efetoras com diferenciação terminal, com e sem expressão de CD27, dentro das células T CD8 (Figura 8). Por fim, para as células B, em função da expressão de CD27 e de IgD e IgM, foram caracterizadas também as subpopulações de células pré-centro germinativo, e pós-centro germinativo, sem e com *switch* (Figura 9).

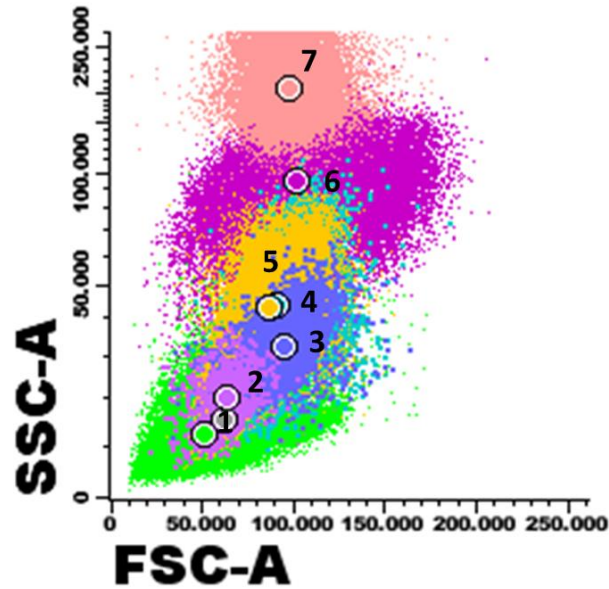


Figura 5: Imagem representativa das populações de leucócitos identificadas pela base de dados EuroFlow, restantes células analisadas: 1 (verde) – Linfócitos; 2 (roxo) – Basófilos; 3 (azul) – Células Dendríticas Plasmacitoides; 4 (azul turquesa) - Monócitos CD16+; 5 (amarelo) – Monócitos; 6 (violeta) – Neutrófilo, e 7 (rosa) – Eosinófilos. SSC- Side Scatter, FSC – Forward Scatter.

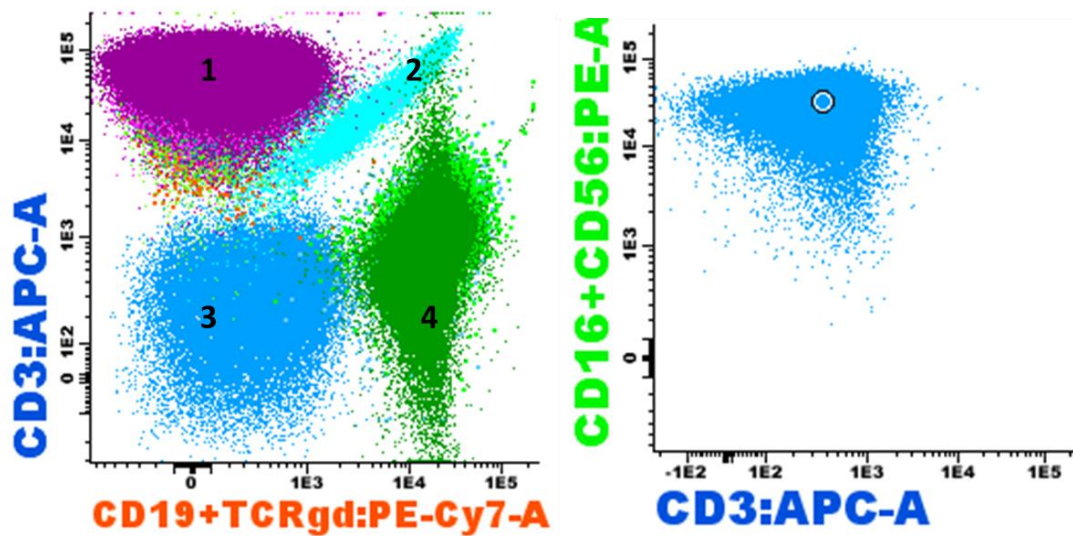


Figura 6: Imagens representativas da identificação das subpopulações de linfócitos identificadas: células T – CD3⁺ (1, células T alfa beta; 2, células T gama delta), células NK – CD3⁺ CD16⁺CD56⁺ (3) e células B – CD19⁺ (4).

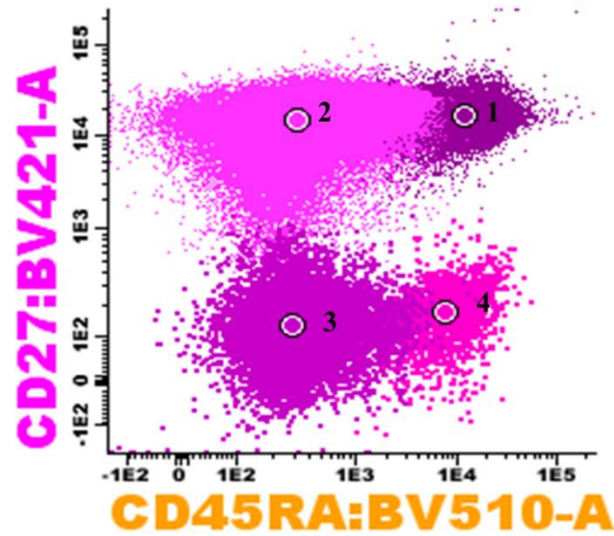


Figura 7: Imagem representativa da caracterização da população de células T CD4 em função da expressão de CD27 e CD45RA, onde se observa o percurso de diferenciação destas células, nomeadamente em células Naive CD27+ CD45RA+ (1), células de Memória Central/ de Transição, CD27+ CD45RA- (2), células de Memória Efetora, CD27- CD45RA- (3) e células Efetoras com diferenciação terminal, CD27-CD45RA+ (4).

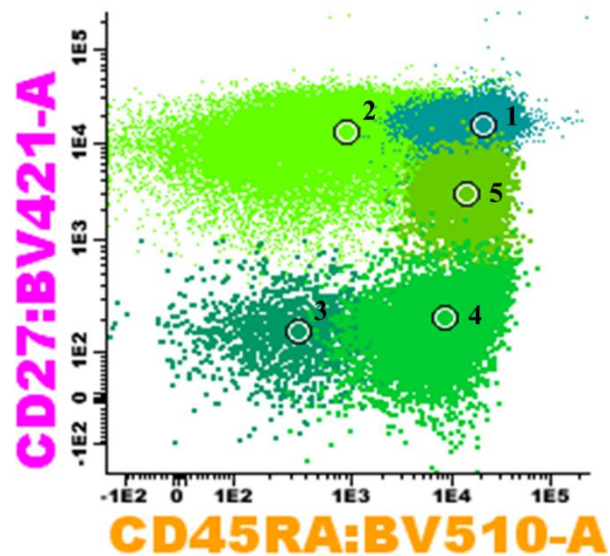


Figura 8: Imagem representativa da caracterização da população de células T CD8 em função da expressão de CD27 e CD45RA, onde se observa o percurso de diferenciação destas células, nomeadamente em células Naive CD27+ CD45RA+ (1), células de Memória Central/ de Transição, CD27+ CD45RA- (2), células de Memória Efetora, CD27- CD45RA- (3), células Efetoras com diferenciação terminal sem expressão de CD27, CD27-CD45RA+ (4) e células Efetoras com diferenciação terminal e expressão de CD27d+, CD27d+CD45RA+ (5).

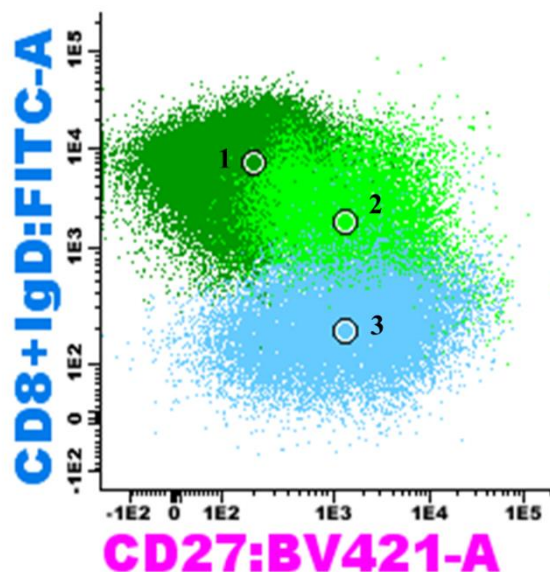


Figura 9: Imagem representativa da caracterização da população de células B onde se observa o percurso de diferenciação destas células, nomeadamente em células B Pré-Centro Germinativo, IgD+IgM+CD27- (1), B Pós-Centro Germinativo Unswitched, IgD+IgM+CD27+ (2) e Switched, IgD-IgM-CD27+ (3).

Para a análise dos perfis de diferenciação específicos T e NKT, foi seguida a estratégia representada nas figuras 10 a 12. Assim, a Figura 10 representa a estratégia de análise para identificação das células T, CD3+, a partir dos singletos de linfócitos, e sequencialmente, das populações de células T CD4 (CD8-) e T CD8. Depois, na Figura 11, apresenta-se a caracterização das células T CD4 e T CD8 em função da expressão dos recetores de quimiocinas CXCR3 e CCR6, tal como definido pelo *Human Immunology Project* (55), para a caracterização de células Th1, Th2, e Th17. Finalmente, a Figura 12 representa a análise efetuada para a identificação e caracterização das subpopulações de células NKT invariáveis (iNKT), isoladas a partir da expressão de 6B11, um anticorpo monoclonal que reage especificamente com uma região invariante da cadeia V α 24-J α Q do TCR, expressa tipicamente por estas células. A partir da sua identificação, fez-se posteriormente a caracterização das subpopulações de células iNKT em função da expressão de CD4 e CD8.

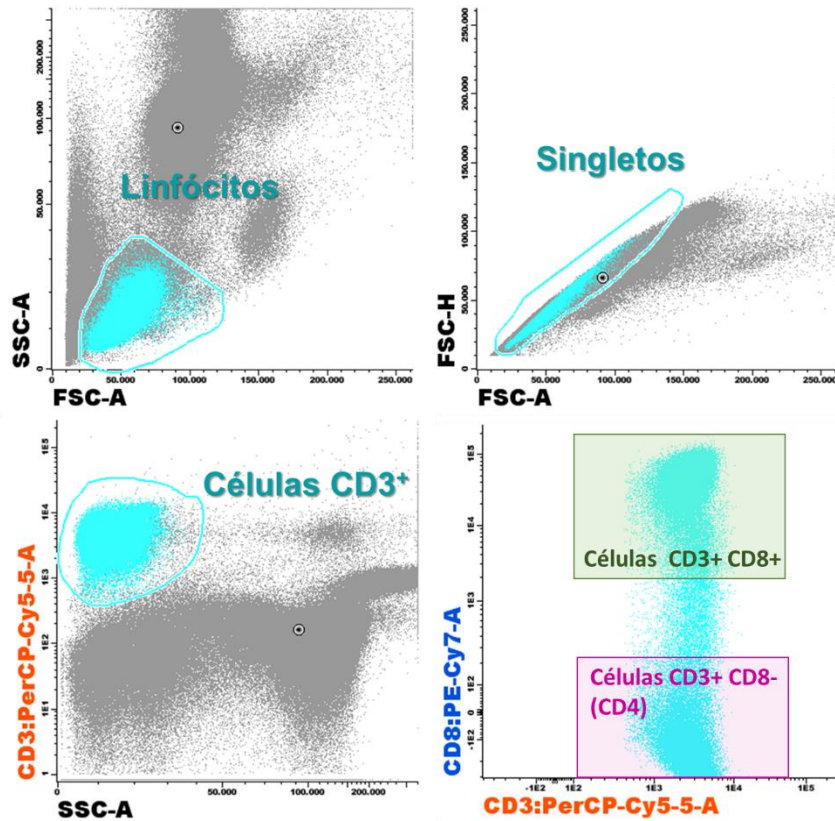


Figura 10: Estratégia de gating e identificação de Linfócitos T CD3+, e a partir daqui, das células T CD4 (CD8-) e das células T CD8 (CD8+). SSC – Side Scatter. FSC – Side Scatter, A – Area, H- Height (altura).

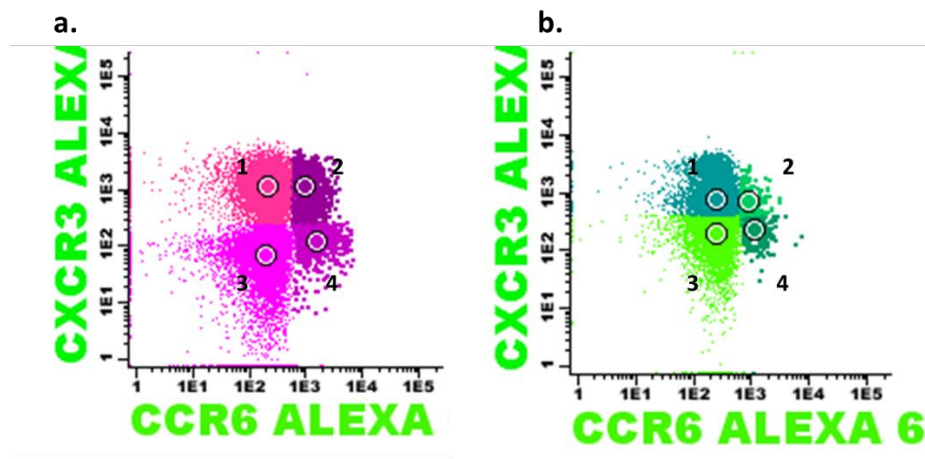


Figura 11: Estratégia de análise representativa da caracterização do perfil de diferenciação de células T CD4 e T CD8, em função da expressão dos receptores de citocinas CXCR3 e CCR6. a. Células T CD4: 1. Células Th1 – CXCR3+ CCR6-; 2. Células Th1/Th17 – CXCR3+ CCR6+; 3. Células Th2/Treg – CXCR3- CCR6-; 4. Células Th17 – CXCR3- CCR6+. b. Células T CD8: 1. Células Tc1 – CXCR3+ CCR6-; 2. Células Tc1/Tc17 – CXCR3+ CCR6+; 3. Células Tc2 – CXCR3- CCR6-; 4. Células Tc17 – CXCR3- CCR6+.

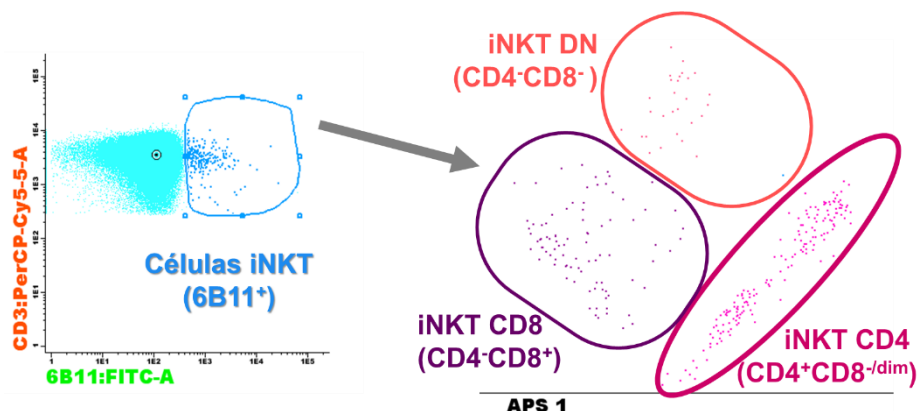


Figura 12: Esquema representativo para a identificação das células NKT invariáveis (iNKT), a partir da expressão de 6B11+ dentro da população de células T CD3+. De acordo com a expressão de CD4 e CD8, e usando a funcionalidade de análise APS – Automatic Population Separator, fez-se posteriormente a separação das células em iNKT nas suas respectivas subpopulações de células iNKT CD4, iNKT CD8 e iNKT DN (duplas negativas).

2.6 Doseamento de Mediadores Imunes Solúveis

2.6.1 Estudo da proteína humana MBL – Lectina ligadora de manose

Para a quantificação dos níveis séricos de Lectina ligadora de manose (MBL – *Mannose-Binding Lectin*) foi utilizado um imunoensaio enzimático, em concreto o kit Quantikine® ELISA Human MBL Immunoassay. Este kit utiliza uma técnica de imunoensaio enzimático em microplaca pré-revestida com um anticorpo monoclonal específico para a MBL humana, ao qual se irá ligar a proteína em estudo presente em cada amostra.

No início do ensaio foram preparados todos os reagentes necessários, bem como das amostras a ensaiar, que foram deixadas descongelar à temperatura ambiente.

Para a preparação do tampão de lavagem foi efetuada uma diluição de 1:25, na qual se diluíram 20ml do reagente *Wash Buffer* em 480ml de água destilada. Na preparação do Diluente do Calibrador RD5-26 (RD5-26) foi necessária uma diluição de 1:4, em que se adicionaram 20ml do reagente a 60ml de água destilada.

Para a preparação das amostras foi necessária uma diluição de 1:400. Assim, para cada amostra, foram realizadas duas diluições sequenciais: na primeira adicionaram-se 10µl de amostra a 190µl de RD5-26 (diluído a 1:4) e de seguida, desta amostra diluída a 1:20, fez-

se nova diluição de 1:20, adicionando-se 10µl a 190µl de RD5-26 (diluído a 1:4), ficando a diluição final de 1:400.

De seguida, deu-se início à preparação dos calibradores. Assim, foi reconstituído o *Standard* do kit com 1.0ml de RD5-26 (diluído a 1:4), homogeneizou-se a preparação para garantir a reconstituição total e manteve-se em repouso durante 5 minutos, com agitação suave. Marcaram-se depois 8 tubos Eppendorf com as seguintes diluições (em ng/ml), 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 e 0. Pipetaram-se 900µl de RD5-26 (diluído a 1:4) para o tubo de 10ng/ml e 500µl para os restantes tubos. O *Standard* reconstituído anteriormente serviu para produzir as diluições em série, adicionando-se 100µl ao primeiro tubo de 10ng/ml. Foi homogeneizada a mistura e desse tubo pipetaram-se 500µl para o segundo tubo de 5ng/ml e assim sucessivamente até ao tubo de 0.156ng/ml. O tubo 0 tinha apenas 500 µl de RD5-26 (diluído a 1:4), servindo como padrão zero. Antes de cada transferência foi feita sempre uma ligeira agitação para misturar completamente o conteúdo dos tubos.

Na preparação da microplaca, adicionaram-se 50µl de *Assay Diluent* RD1-21 em todos os poços, e de seguida 50µl de cada *Standard*, amostra e ou controlo, em duplicado, de acordo com a planificação da microplaca preparada previamente. A placa foi então coberta com a película adesiva fornecida no kit e incubada durante 2 horas com agitação ajustada a 500 ± 50 rpm, à temperatura ambiente. No final da incubação, procedeu-se à aspiração e lavagem da microplaca em lavador de microplacas automático, com 8 canais. O processo de aspiração e lavagem foi efetuado 4 vezes. No final da última lavagem foi necessário remover bem qualquer tampão restante nos poços, invertendo a placa e limpando-a contra papel limpo. Posteriormente adicionaram-se, a cada poço, 100µl do anticorpo específico para a MBL conjugado com a enzima peroxidase, e novamente foi coberta a placa com película adesiva, tendo-se seguido nova incubação de 2 horas, agora sem agitação, à temperatura ambiente e no escuro. Após a incubação repetiu-se o processo de lavagem descrito acima. Ainda durante o tempo de espera da incubação preparou-se a solução de substrato, misturando-se os *Reagentes A e B* em quantidades iguais, i.e. 5ml de cada um, e após a lavagem, a cada poço adicionaram-se 100µl da solução de substrato preparada, tendo sido incubada a placa novamente durante 30 minutos à temperatura ambiente, sem agitação e protegida da luz. No final dos 30 minutos, adicionaram-se 100µl

da solução Stop a cada poço da microplaca, fazendo-se uma agitação leve para garantir uma mistura completa dos componentes. Finalmente, deu-se início à leitura da densidade ótica de cada poço com recurso a um leitor de microplacas (Awareness Technology™ Stat Fax 2100), com filtro de leitura para 450nm com correção a 630nm.

A partir dos valores de concentração dos calibradores e respetivas absorvâncias, foi obtida uma curva de calibração utilizada para determinar a concentração de MBL nas amostras. Para este efeito foi usado o software livre ELISA-Logit-V24May2017, disponível online em <https://ednieuw.home.xs4all.nl/Calibration/Logit/Logit.htm>. O kit utilizado apresenta linearidade entre 0.2 - 10 ng/ml, com sensibilidade de 0.029ng/ml.

2.6.2 Estudo da proteína CD40L – CD40 ligando

Para a quantificação dos níveis séricos de CD40 ligando (CD40L) foi utilizada a tecnologia de imunoensaio multiplex, avaliado por Citometria de Fluxo, com recurso à plataforma *Cytometric Bead Array* (BD Biosciences). Este é um sistema de captura de um ou vários analitos com o uso de microesferas de tamanho e fluorescência conhecidas (*beads*), que posteriormente são detetados num citómetro de fluxo. Neste sistema, para a deteção de cada proteína é essencial a utilização de dois reagentes, o reagente de captura com microesferas, *Capture Beads*, e um reagente de deteção. Assim, no reagente de captura, cada *Capture Bead* tem uma quantidade limitada e distintiva de uma determinada fluorescência, e é revestida por um anticorpo específico para cada proteína que se pretende analisar. O reagente de deteção (*Detection Reagent*) é uma mistura de anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE) que são também específicos para as proteínas a analisar. Assim, quando as proteínas a analisar tiverem ficado ancoradas nas esferas de deteção, os anticorpos conjugados vão ligar-se a elas de forma proporcional, o que fornecerá depois uma emissão de PE proporcional à quantidade de analito ligado às *Capture Beads*. Ou seja, após as microesferas e o reagente de deteção serem incubados com as amostras onde existirão os analitos que se pretendem quantificar, há formação de um complexo que pode ser avaliado posteriormente por Citometria de fluxo.

Para o estudo desta proteína foi utilizado o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer (BD Biosciences), que suporta os reagentes a usar

na plataforma BD™ CBA, neste caso conjugado com o BD™ CBA Human sCD154 (sCD40 Ligand) Flex Set (Ref. 560305, BD Biosciences).

O procedimento usado seguiu as recomendações do fabricante. Em resumo, inicialmente procedeu-se à preparação dos calibradores (a partir do Standard fornecido no kit sCD40 Ligand Flex Set. Para isso, transferiu-se a esfera com a proteína CD40L liofilizada, do frasco do kit para um tubo de polipropileno de 15ml e identificado como “Top Standard”, e reconstituiu-se com 4ml de Assay Diluent. A mistura foi mantida à temperatura ambiente, sem agitação, durante 15 minutos. Marcaram-se depois 8 tubos Falcon de citometria com a seguinte ordem de diluição: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256 e em cada um colocaram-se 500µl de Assay Diluent. Procedeu-se então à diluição em série transferindo 500µl do “Top Standard” para o tubo 1:2. Desse tubo retiraram-se 500µl para o tubo 1:4 e assim sucessivamente até completar a diluição em série no tubo 1:256. Entre cada diluição foi feita apenas uma ligeira mistura com a pipeta para homogeneizar as soluções. Preparou-se também um tubo apenas com 500µl de Assay Diluent, identificado como 0 que serviu como branco.

De seguida, foi necessário determinar o volume necessário de solução de Capture Beads, tendo em conta que por cada tubo seria necessário 1 µl de Capture Beads. Ou seja, 1 µl equivale a 1 teste, assim sendo, para 60 testes (50 amostras + 10 Standards) seriam necessários 60µl de Capture Beads. Tendo em conta que cada tubo deverá ter 50µl de Capture Beads diluídas, para 60 amostras o volume final de beads diluídas teria de ser 3000µl. Assim, foram ressuspensas as microesferas contidas no frasco original por vortexação forte durante 15 segundos, e depois pipetaram-se 60µl de Capture Beads do frasco para um tubo identificado como “Mixed Capture Beads” e de seguida adicionaram-se 0.5ml de Wash Buffer e centrifugou-se a mistura a 200g durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado por aspiração, de maneira a não tocar no *pellet* e ressuspendeu-se de seguida em 3000µl de Capture Bead Diluent para Soro/Plasma. De seguida foi necessária uma nova vortexação seguida de uma incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro.

Nesse tempo de espera procedeu-se à preparação da diluição do reagente de deteção PE (*PE Detection Reagent*). Para tal foi necessário novamente determinar o volume total de

PE Detection Reagent diluído requerido para a experiência: assim, se cada tubo requer 50µl *PE Detection Reagent* diluído, para 60 tubos foi necessário obter um volume total de 3000µl. De seguida determinou-se o volume necessário a utilizar de *PE Detection Reagent*, em que 1µl do reagente equivale a 1 teste, assim sendo para 60 testes foram necessários 60µl do reagente. Posteriormente determinou-se o volume de *PE Detection Reagent Diluent*, necessário para a diluição, que se calculou subtraindo o volume calculado de *PE Detection Reagent* ao volume total calculado para a experiência (3000µl – 60µl = 2940µl). Assim sendo para perfazer o volume final calculado, de 3000µl, foram pipetados 60µl de *PE Detection Reagent* e 2940µl de *Detection Reagent Diluent* para um tubo identificado como “Mixed PE Detection Reagents”, guardado a 4°C e protegido da luz até ser utilizado.

Realizadas as preparações dos componentes necessários para o ensaio, seguiu-se para o procedimento de ensaio para tubos. Assim, a tubos identificados com as diluições e concentrações apresentadas na Tabela 2, adicionaram-se respetivamente 50µl das diluições do Standard acima referidas.

Tabela 2: Identificação dos tubos e respetivas diluições e concentrações finais de CD40L

Tubo	Diluição	Concentração (pg/ml)
1	Apenas <i>Assay Diluent</i>	0 (controlo negativo)
2	1:256	10
3	1:128	20
4	1:62	40
5	1:32	80
6	1:16	156
7	1:8	312,5
8	1:4	625
9	1:2	1250
10	Top Standard	2500

Posteriormente adicionaram-se 50µl de cada amostra a tubos Falcon de Citometria numerados de 1 a 50. Antes de utilizar a solução de “Mixed Capture Beads” foi necessário vortexar durante 5 segundos e de seguida adicionaram-se 48µl a cada um dos 60 tubos, com uma ligeira mistura com a pipeta. Incubaram-se os tubos durante 1 hora à temperatura ambiente. No final dessa incubação, adicionaram-se 48µl da solução de “Mixed PE Detection Reagent” também previamente ressuspensa com o auxílio de uma pipeta. Após a junção do reagente de deteção as amostras foram novamente incubadas, agora durante 2 horas à temperatura ambiente, no escuro.

No final da incubação adicionou-se 1ml de Wash Buffer a cada um dos tubos, que foram posteriormente centrifugados a 200g durante 5 minutos. Os sobrenadantes de cada tubo foram então aspirados de maneira a não perturbar o *pellet*, e finalmente adicionaram-se 300µl de Wash Buffer a cada tubo. Os tubos foram ligeiramente homogeneizados e lidos um a um no citómetro, previamente preparado para este efeito aquando da incubação maior das amostras. Inicialmente foram adquiridos os tubos dos Standards, numa ordem crescente da concentração e seguidos das amostras. A análise dos resultados foi efetuado com o Software FCAP Array versão 3 (BD Biosciences). Resumidamente, para cada tubo, as esferas adquiridas foram identificadas de acordo com o seu tamanho e com os níveis de fluorescência em APC e APC-H7 (sCD40L – posição C7), como demonstrado na Figura 13. Depois, a intensidade de fluorescência em PE das amostras dos calibradores foi usada para a obtenção de uma curva de calibração, a partir da qual se avaliaram depois as amostras de doentes e controlos.

Para o CD40L o kit apresenta linearidade entre 10-2 500 pg/ml, com um limite de deteção teórico de 2.3 pg/ml. As amostras com valores superiores a 2500 pg/ml foram posteriormente diluídas com Assay Diluente, de forma a serem enquadradas no intervalo de ensaio, sendo depois afetados do respetivo fator de diluição usado.

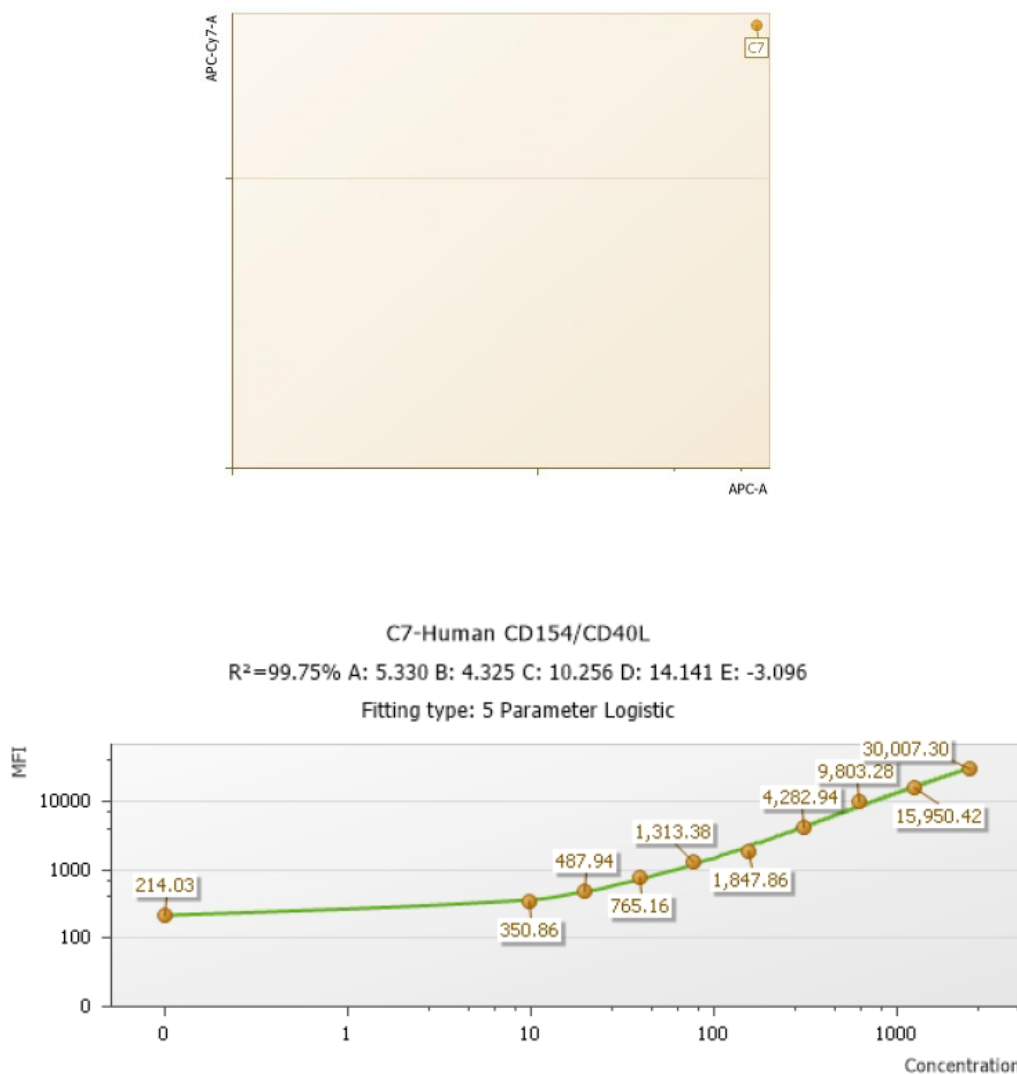


Figura 13: Esquema representativo da identificação das esferas de captura em função dos níveis de fluorescência em APC e APC-H7 (sCD40L – posição C7) e curva de calibração obtida com os valores de intensidade de fluorescência dos calibradores preparados no ensaio. MFI – Mean fluorescence intensity.

2.7 Análise Estatística

Toda a estatística realizada ao longo deste estudo foi feita através do programa GraphPadPrism™ 6.0 (*Graph Pad Software, San Diego, CA, USA*). Tanto os dados demográficos como os dados clínicos, foram apresentados como média (dp) ou mediana [QI], de acordo com a normalidade da distribuição, que foi avaliada através dos testes de normalidade D'Agostino & Pearson omnibus e Shapiro-Wilk. Na comparação dos grupos de doentes e controlos, e na comparação dos subgrupos de doentes foram utilizados os testes de Fisher e do Qui-quadrado, para a avaliação de variáveis categóricas, e o teste não paramétrico de Mann-Whitney para as variáveis contínuas. Para a significância estatística foi considerado o valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Caracterização Demográfica

Neste estudo foram incluídos 30 doentes com diagnóstico de Drepanocitose, seguidos na consulta de Hematologia do Hospital Dona Estefânia, da Região de Lisboa Central (Centro Hospitalar de Lisboa Central, CHLC). A caracterização demográfica da população estudada apresenta-se na Tabela 3.

Tabela 3.: Caracterização demográfica da população estudada.

Doentes (n=30)	
Sexo	
Feminino	14 (46,7%)
Masculino	16 (53,3%)
Idade (anos)	9 [IQ: 5;15]
Idade ao Diagnóstico (anos) *	1 [IQ: 0,5;16]
Hemoglobinopatias	
- SS	22 (73,3%)
- SC	2 (6,7%)
- SS+ alfa delta	4 (13,3%)
- SB0	2 (6,7%)
Hemoglobina Fetal – HbF (%)**	10,45 (7,09)
História de STA	12 (40%)
Terapêutica instituída	10 (33,3%)
- Hidroxiureia	

Média (desvio-padrão). Mediana [Intervalo Interquartis IQ]. * n= 27. ** n=28

Os doentes com Drepanocitose incluídos no estudo foram posteriormente divididos de acordo com a ocorrência ou não de episódios de Síndrome Torácica Aguda (STA). A caracterização destes subgrupos encontra-se na Tabela 4. Pode observar-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois subgrupos em relação a sexo e idade.

Também na Tabela 4 se pode observar que o número de doentes sob terapêutica é significativamente maior entre os doentes que apresentam episódios de STA, ao contrário do que acontece nos doentes que não apresentam história de STA, dos quais a grande maioria não se encontrava medicada.

Tabela 4: Comparação dos dados demográficos e clínicos em doentes com e sem histórico de STA

Doentes (n=30)	Com STA (n=12)	Sem STA (n=18)	P-value
Idade (anos)	9,50 [5,25;13,50]	8,50 [5,50;15,00]	0,9908*
Sexo			0,7220 [#]
Feminino	5	9	
Masculino	7	9	
HbF (%)	11,40 [4,55;16,23]	7,60 [3,92;13,70]	0,4159*
Com terapêutica	7 (58,3%)	3 (16,7%)	0,0450 [^]
Sem terapêutica	5 (41,7%)	15 (83,3%)	

Média (desvio-padrão). Mediana [Intervalo Interquartis IQ].

* Teste Mann-Whitney

[#] Teste de Fisher

[^] Teste Qui-Quadrado

Foi igualmente avaliada a população de doentes com Drepanocitose relativamente à terapêutica instituída - com ou sem administração de Hidroxiureia, tal como se apresenta

na Tabela 5 Tal como para a comparação anterior, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois subgrupos (com e sem terapêutica) em relação a sexo e idade.

Tabela 5: Comparação dos dados demográficos em doentes com e sem Terapêutica (Hidroxiureia).

Doentes (n=30)	Com Terapêutica (n=10)	Sem Terapêutica (n=20)	P-value
Idade (anos)	7,50 [4,75;13,25]	9,5 [6,00;15,00]	0.7515*
HbF (%)	10,35 [5,50;14,05]	8,8 [3,95;16,63]	0,9530*
Sexo			0.7089#
Feminino	4	10	
Masculino	6	10	

Mediana [Intervalo Interquartis IQ].

* Teste Mann-Whitney

Teste de Fisher

3.2 Imunofenotipagem Celular - Analise com a Base de Dados EuroFlow para PIDOT

Todos os doentes foram analisados de acordo com a Base de Dados EuroFlow para o tubo PIDOT, permitindo a caracterização de células maduras T, B e NK, para além da avaliação de outras populações de leucócitos, nomeadamente Neutrófilos, Monócitos, Monócitos CD16⁺, Eosinófilos, Basófilos e Células Dendríticas Plasmacitoides.

A tabela 6 apresenta os resultados das populações celulares estudadas, evidenciando os valores percentuais (em relação à celularidade total, como previsto na Base de Dados EuroFlow) e os valores absolutos, em células por μl .

Tabela 6: Resultados das subpopulações celulares caracterizadas na população de Doentes drepanocíticos

Doentes (n=30)	%*	Céls/ μ l
Linfócitos	44.77 (12,74)	3912 (1606)
Células B	8,45 [6,05;11.03]	725 [442,8;1118]
Pré-centro germinativo	6,60 [4,80;8,90]	481,5 [364,8;875]
Pós-centro germinativo	1,5 [1,10;2,00]	149,7 (77,39)
Unswitched	0,49 [0,34;0,76]	38,80 [27,68;88,08]
Switched	1,050 [0,64;1,40]	78,50 [47,15;136,3]
Células T	28,56 (9,004)	2425 (832,4)
CD4 ⁺ CD8 ⁻	16,49 (5,778)	1380 (461,9)
CD4 ⁺ Naive	8,773 (5,148)	717,8 (409,4)
CD4 ⁺ Memória Central	6,363 (2,163)	538,7 (196,9)
CD4 ⁺ Memória Efetora	0,9850 [0,67;1,50]	89,60 [52,43;139]
CD4 ⁺ Efetor TD	0,0355 [0,00;0,18]	2.80 [0,04;12,3]
CD8 ⁺ CD4 ⁻	7,65 [5,08;10,68]	558,5 [456,5;992,3]
CD8 ⁺ Naive	3,25 (1,92)	229,5 [144,5;371,8]
CD8 ⁺ Memória Central	2,22 (1,09)	191,2 (107,3)
CD8 ⁺ Memória Efetora	0,21 [0,13;0,64]	21,85 [7,25;55,15]
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁺ d	0,12 [0,03;0,37]	14,20 [1,83;27,85]
CD8 ⁺ Efetor TD 27 ⁻	0,85 [0,54;2,23]	63,10 [28,50;199,5]
CD4 ⁻ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁺	3,00 [1,88;5,10]	248,0 [135,8;404,3]
CD4 ⁻ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁻	0,45 (0,18)	32,25 [27,25;46.33]

Células NK	6,05 [4,48;8,63]	423,0 [322,5;947,5]
Eosinófilos	2,05 [0,88;3,40]	138,5 [81,13;244,5]
Neutrófilos	42,39 (12,90)	3504 [2447;5439]
Monócitos	7,94 (3,78)	712,8 (431,3)
Monócitos CD16 ⁺	0,83 [0,39;1,65]	56,80 [32,78;117,5]
Células dendríticas plasmacitoides	0,29 [0,17;0,42]	22,90 [13,78;32,58]
Basófilos	0,79 [0,55;1,00]	67,45 [39,60;78,33]

Legenda: * Percentagem em relação à celularidade total. + positivo; - negativo; +d positivo fraco (*dim*). Media (sd); Mediana [Intervalo InterQuartil]

Tendo em conta as variações nas diferentes subpopulações celulares encontradas em idades pediátricas, a caracterização de doentes pela base de dados EuroFlow é na realidade dividida em distintas faixas etárias, para as quais se estabeleceram por isso diferentes intervalos de referências pelo consórcio. A divisão dos doentes deste estudo de acordo com estas faixas etárias apresenta-se na Tabela 7.

Tabela 7: Distribuição dos doentes do estudo de acordo com as faixas etárias da Base de Dados EuroFlow para o PIDOT

Faixa etária (anos)	Nº	Com STA	Sem STA	Com terapêutica	Sem terapêutica
≤4	6	2	4	2	4
5-9	10	4	6	4	6
10-15	10	4	6	2	8
>16	4	2	2	2	2
Total	30	12	18	10	20

Na generalidade, não houve um padrão de alteração em relação aos valores de referência previstos na base de dados em qualquer das subpopulações celulares estudadas, nem na

avaliação do grupo total nem na avaliação de nenhum dos subgrupos, divididos por faixa etária. Ainda assim, houve alterações pontuais, sobretudo ao nível das subpopulações de linfócitos, denotando algumas tendências, que se relatam de seguida.

No grupo com idade inferior ou igual a 4 anos, foram incluídos 6 doentes, tendo-se verificado as seguintes alterações:

Células B:

- Aumento da % de células B *Switched*.

Células T:

- Aumento de células T CD8⁺CD4⁻ Efetoras TD 27⁻ (% e valor absoluto), com diminuição da % de células T CD8⁺CD4⁻ Naive;
- Aumento da % e do valor absoluto de células T CD4⁺ de memória efetora.

Células NK:

- Aumento do valor absoluto de células NK.

O grupo dos 5 aos 9 anos, constituído por 10 doentes, foi aquele onde se registaram mais alterações. Assim, há a relatar neste grupo:

Células B:

- Aumento da % e do valor absoluto de Células B;
- Aumento da % de células B Pré-Centro Germinativo;
- Aumento do valor absoluto de células B Pré-Centro Germinativo;
- Diminuição % e do valor absoluto de células B *Unswitched*.

Células T:

- Aumento da % de células T TCRgd⁺;
- Aumento do valor absoluto de células T TCRgd⁺;
- Diminuição da % de células T CD4⁺CD8⁻ Naive;

- Aumento da % células e nº de células/ μ l de células T CD4⁺CD8⁻ Memória Central;
- Aumento da % de células T CD4⁺CD8⁻ Efetoras TD;
- Aumento do valor absoluto de células T CD4⁺CD8⁻ Efetoras TD;
- Aumento do valor absoluto de células T CD8⁺CD4⁻;
- Aumento da % e do valor absoluto de células T CD8⁺CD4⁻ Efetoras TD CD27⁻;
- Diminuição da % e do valor absoluto de células T CD8⁺CD4⁻ Efetoras TD27⁻;
- Aumento do valor absoluto de células T CD8⁺CD4⁻ Memória Central.

O grupo dos 10 aos 15 anos, também constituído por 10 doentes, apresentou as alterações relatadas de seguida:

Células B:

- Diminuição da % de células B *Switched*;
- Aumento do valor absoluto de células B Pré-Centro Germinativo;
- Aumento do valor absoluto de células B Pós-Centro Germinativo;
- Aumento do valor absoluto de células B *Unswitched*.

Células T:

- Aumento do valor absoluto de células T;
- Aumento do valor absoluto de células T CD4⁺CD8⁻ ;
- Aumento do valor absoluto de células T CD4⁺CD8⁻ Memória Central;
- Aumento do valor absoluto de células T CD4⁺CD8⁻ Efetoras TD;
- Diminuição da % de células T CD8⁺CD4⁻;
- Diminuição da % e do valor absoluto de células T CD8⁺CD4⁻ Naive;
- Diminuição da % de células T CD8⁺CD4⁻ Memória Central;
- Diminuição do valor absoluto de células T CD8⁺CD4⁻ Memória Central.

Células NK:

-Aumento do valor absoluto de células NK.

Finalmente, no grupo com idades superiores a 16 anos, constituído por 4 doentes, só houve a reportar diminuição da percentagem de células T CD8⁺CD4⁻ Efectoras TD CD27⁺d.

Assim, nesta análise mais pormenorizada, ainda que não pareça possível identificar dentro do compartimento B um perfil típico, dentro das células T, é notória a tendência para compartimentos mais diferenciado em doentes com Drepanocitose, ou seja ou com valores mais baixos de células naive e/ou com valores mais elevados das distintas subpopulações de células de memória e efectoras, em comparação com a Base de Dados EuroFlow, que resulta do estudo de uma extensa coorte de crianças de centros de investigação de toda a Europa, incluindo Portugal.

3.3 Avaliação das Subpopulações Celulares de acordo com a Base de Dados EuroFlow para PIDOT em Doentes com e sem história de STA

Na Tabela 8 são apresentados os resultados obtidos relativamente à percentagem de células (em relação à celularidade total) dos doentes com e sem história de STA. Apenas se observou uma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de doentes para a população de células dendríticas plasmacitoides ($p=0,0267$), com os doentes sem STA a apresentarem uma percentagem maior destas células.

Na Tabela 9 são apresentados os resultados obtidos relativamente ao número de células por μ l dos doentes com e sem histórico de STA e observa-se que não há qualquer relação relativamente aos valores obtidos e os dois grupos de doentes.

Tabela 8: Resultados obtidos relativamente à percentagem (%) de células dos doentes com e sem histórico de STA.

Populações (%)	Sem STA (n=18)	Com STA (n=12)	P- value
Linfócitos	44,10 [35,33;55,73]	38,50 [22,50;59,70]	0,6789
Células B	9,05[6,75;11,03]	6,75[5,23;14,25]	0,4333
Pré-centro germinativo	7,45 [5,30;9,00]	5,15 [4,16;9,28]	0.2996
Pós-centro germinativo	1,55 [1,78;2,00]	1,40 [1,10;2,30]	0,8918
Unswitched	0,47 [0,35;0,96]	0,57 [0,31;0,66]	0,8595
Switched	1,10 [0,65;1,33]	0,96 [0,63;1,70]	0,8103
Células T	27,75 [23,60;37,18]	26,60 [22,85;32,20]	0,6540
CD4 ⁺ CD8 ⁻	17,50 [12,83;21,50]	14,50 [10,33;18,28]	0,3627
CD4 ⁺ Naive	8,40 [4,70;13,65]	8,75 [3,40;11,28]	0,7784
CD4 ⁺ Memória Central	6,10 [4,58;9,23]	6,05 [4,13;6,88]	0,3959
CD4 ⁺ Memória Efetora	1,25 [0,65;1,82]	0,93 [0,69;1,08]	0,1814
CD4 ⁺ Efetoras TD	0,07 [0,00;0,23]	0,01 [0,00;0,14]	0,2182
CD8 ⁺ CD4 ⁻	7,85 [5,30;11,28]	7,20 [4,80;9,20]	0,3740
CD8 ⁺ Naive	2,75 [1,58;4,53]	2,90 [1,78;4,43]	0,8106
CD8 ⁺ Memória Central	2,45 [1,50;3,05]	1,95 [0,94;2,85]	0,4076
CD8 ⁺ Memória Efetora	0,19 [0,13;0,64]	0,26 [0,10;0,73]	0,6686
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁺ d	0,08 [0,02;0,31]	0,20 [0,09;0,43]	0,2804
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁻	0,85 (0,54; 2,45)	0,86 [0,34;1,38]	0,5948
CD4 ⁻ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁺	3,00 [1,60;3,58]	3,80 [1,90;7,28]	0,2997
CD4 ⁻ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁻	0,53 [0,38;0,68]	0,38 [0,27;0,44]	0,0543
Células NK	6,10 [3,70; 9,78]	6,00 [5,08;8,35]	0,8923

Eosinófilos	2,40 [0,95;3,68]	1,60 [0,85;3,05]	0,2528
Neutrófilos	41,65 (32,03;51,08)	49,80 [29,13;54,83]	0,4333
Monócitos	8,85 [3,00;11,98]	7,20 [5,30;9,93]	0,5380
Monócitos CD16 ⁺	0,81 [0,41;1,30]	0,99 [0,29;1,80]	0,6840
Células dendríticas plasmacitoides	0,36 [0,23;0,43]	0,18 [0,14;0,29]	0,0267
Basófilos	0,83 [0,66;1,03]	0,71 [0,34;0,92]	0,2272

Legenda: * Percentagem em relação à celularidade total. + positivo; - negativo; +d positivo fraco (*dim*); Mediana [Intervalo InterQuartil]. Teste Mann-Whitney

Tabela 9: Resultados obtidos relativamente ao número de células por μ l dos doentes com e sem histórico de STA

Células/μl	Sem STA (n=18)	Com STA (n=12)	P- value
Linfócitos	3651 [2406;4696]	3510 [2956;5097]	0,9665
Células B	809,0 [405,5;1151]	649,0 [461,0;890,3]	0,5904
Pré-centro germinativo	676,0 [318,0;967,5]	424,0 [379,3;749,8]	0,3837
Pós-centro germinativo	110,0 [81,03;199,3]	144,5 [85,3;242,0]	0,6389
Unswitched	37,20 [25,23;108,0]	46,00 [28,85;85,28]	0,5803
Switched	75,70 [45,90;122,3]	86,05 [49,45;168,5]	0,2711
Células T	2407 [1749;3068]	2204 [1972;2796]	0,8038
CD4+CD8-	1481 [1016;1796]	1217 [1133;1643]	0,6194
CD4+ Naive	621,5 [327,5;1160]	622,0 [372,3;1009]	>0,9999
CD4+ Memória Central	581,0 [387,3;739,3]	464,0 [411,5;565,5]	0,4557
CD4+ Memória Efetora	96,95 [53,90;159,8]	83,60 [50,28;103,6]	0,3189
CD4+ Effetor TD	5,45 [0,13;13,20]	1,15 [0,01;15,68]	0,2430
CD8+CD4-	604,5 [476,8;1035]	551,5 [386,8;971,0]	0,5621
CD8+ Naive	248,0 [116,3;394,0]	211,0 [179,5;314,0]	0,6998
CD8+ Memória Central	192,5 [107,3;259,8]	198,0 [66,13;236,0]	0,5244
CD8+ Memória Efetora	192,5 [107,3;259,8]	24,95 [10,33;43,93]	0,6843
CD8+ Efetoras TD 27+d	10,15 [1,55;22,30]	15,85 [8,75;31,15]	0,4458
CD8+ Efetoras TD 27-	63,10 [21,58;228,3]	65,10 [40,05;90,35]	0,9103
CD4-CD8-/dim TCRgd+	207,0 [111,3;404,3]	306,0 [178,0;520,8]	0,1846
CD4-CD8-/dim TCRgd-	33,50 [26,88;57,48]	30,45 [27,15;37,25]	0,2710

Células NK	396,5 [315,8;819,8]	523,5 [329,0;850,5]	0,5415
Eosinófilos	181,0 [90,73;279,3]	130,5 [68,63;173,3]	0,2037
Neutrófilos	3418 [1991;5056]	3811 [2800;6680]	0,4368
Monócitos	683,5 [320,3;1132]	581,0 [444,8;2,3]	0,8359
Monócitos CD16+	55,75 [32,78;105,0]	56,80 [31,63;180,5]	0,7180
Células dendríticas plasmacitoides	25,40 [17,73;42,53]	18,60 [9,60;29,65]	0,1436
Basófilos	67,45 [42,83;102,5]	60,65 [35,85;74,38]	0,5904

Legenda: * Percentagem em relação à celularidade total. + positivo; - negativo; +d positivo fraco (*dim*). Mediana [Intervalo InterQuartil]. Teste Mann-Whitney

3.4 Avaliação das Subpopulações Celulares de acordo com a Base de Dados EuroFlow para PIDOT em Doentes com e sem Terapêutica instituída

Na Tabela 10 são apresentados os resultados obtidos relativamente à percentagem de células dos doentes com e sem terapêutica e observa-se que há algumas diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos, nomeadamente a população de células CD4⁺CD8⁻/*dim* TCRgd⁺ nos doentes com terapêutica apresenta valores mais elevados (p=0,0403), a população de monócitos nos doentes sem terapêutica apresenta valores mais elevados (p=0,0302) e a população de basófilos nos doentes sem terapêutica apresenta valores mais elevados (p=0,0267).

Tabela 10: Resultados obtidos relativamente à percentagem (%) de células dos doentes com e sem terapêutica

%	Sem terapêutica (n=20)	Com terapêutica (n=10)	P-value
Linfócitos	41,65 [33,53;49,65]	42,60 [37,23;64,63]	0,3061
Células B	8,45 [4,93;10,35]	8,30 [6,68;15,70]	0,4281
Pré-centro germinativo	7,40 [3,68;8,33]	5,80 [5,18;10,90]	0,6731
Pós-centro germinativo	1,50 [1,10;1,93]	1,85 [1,18;3,38]	0,1847
Unswitched	0,46 [0,33;0,61]	0,65 [0,34;1,53]	0,0972
Switched	0,94 [0,57;1,2]	1,10 [0,74;1,85]	0,1934
Células T	26,50 [22,63;30,60]	28,75 [24,28;42,15]	0,3556
CD4 ⁺ CD8 ⁻	16,45 [10,88;20,85]	16,60 [10,83;22,70]	0,7703
CD4 ⁺ Naive	7,75 [3,70;11,18]	10,15 [4,20;14,50]	0,3912
CD4 ⁺ Memória Central	5,80 [4,18;9,03]	6,30 [4,65;6,80]	0,8880
CD4 ⁺ Memória Efetora	1,25 [0,67;1,88]	0,89 [0,66;0,96]	0,0620
CD4 ⁺ Effetor TD	0,04 [0,00;0,20]	0,04 [0,00;0,18]	0,6723
CD8 ⁺ CD4 ⁻	7,55 [4,92;10,83]	7,95 [6,53;10,05]	0,6265
CD8 ⁺ Naive	2,65 [1,53;3,85]	3,95 [2,13;6,20]	0,1518
CD8 ⁺ Memória Central	2,10 [1,20;2,78]	2,50 [1,50;3,05]	0,4272
CD8 ⁺ Memória Efetora	0,19 [0,09;0,87]	0,23 [0,13;0,33]	0,8710
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁺ d	0,09 [0,02;0,38]	0,25 [0,07;0,34]	0,4286
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁻	0,85 [0,32;2,98]	0,86 [0,61;1,13]	0,6737
CD4 ⁺ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁺	2,55 [1,40;3,48]	4,65 [2,35;7,70]	0,0403
CD4 ⁺ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁻	0,42 [0,31;0,61]	0,41 [0,35;0,59]	0,8882

Células NK	6,05 [4,03;9,38]	6,05 [4,80;8,25]	0,9569
Eosinófilos	2,40 [0,95;3,55]	1,80 [0,77;2,43]	0,2913
Neutrófilos	47,50 [33,90;51,43]	43,80 [27,50;53,5]	0,9060
Monócitos	9,25 [6,23;11,73]	6,50 [2,63;7,68]	0,0302
Monócitos CD16 ⁺	0,67 [0,34;1,15]	1,14 [0,76;1,88]	0,1113
Células dendríticas plasmacitoides	0,29 [0,18;0,42]	0,27 [0,16;0,43]	0,9225
Basófilos	0,89 [0,64;1,08]	0,63 [0,17;0,88]	0,0267

Legenda: * Percentagem em relação à celularidade total. + positivo; - negativo; +d positivo fraco (*dim*). Mediana [Intervalo InterQuartil]. Teste Mann-Whitney

Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos relativamente ao número de células por μl de doentes com e sem terapêutica e observa-se que há algumas diferenças estatisticamente significativas entre estes dois grupos, nomeadamente a população de células CD4⁺ Memória Central nos doentes sem terapêutica apresenta valores mais elevados ($p=0,0343$), a população de células CD4⁺ Memória Efetora nos doentes sem terapêutica apresenta valores mais elevados ($p=0,0164$), a população de monócito nos doentes sem terapêutica apresenta valores mais elevados ($p=0,0240$) e também a população de basófilos nos doentes sem terapêutica apresenta valores mais elevados ($p=0,0164$).

Tabela 11: Resultados obtidos relativamente ao número de células/ μ l de células dos doentes com e sem terapêutica

Células/ μ l	Sem terapêutica (n=20)	Com terapêutica (n=10)	P- value
Linfócitos	3804 [3217;4917]	2961 [2349;4693]	0,2599
Células B	791,0 [495,8;1141]	610,5 [386,8;1063]	0,4888
Pré-centro germinativo	642,0 [391,8;939,5]	413,0 [305,3;840,8]	0,3410
Pós-centro germinativo	120,5 [84,68;182,3]	151,2 [82,68;254,0]	0,7212
Unswitched	35,70 [27,03;71,68]	43,80 [31,90;94,10]	0,3792
Switched	78,50 [53,55;124,00]	86,20 [45,08;171,8]	0,6573
Células T	2543 [1930;3348]	2010 [1609;2410]	0,1389
CD4 ⁺ CD8 ⁻	1516 [1171;1681]	1149 [785;1542]	0,1389
CD4 ⁺ Naive	659,0[345,3;1117,0]	567,5 [404,0;996,5]	0,8263
CD4 ⁺ Memória Central	581,0 [413,0;759,8]	440,5 [294,0;550,5]	0,0343
CD4 ⁺ Memória Efetora	102,0 [68,33;153,3]	54,80 [39,45;85,13]	0,0164
CD4 ⁺ Effetor TD	2,80 [0,38;19,33]	2,90 [0,02;12,33]	0,6101
CD8 ⁺ CD4 ⁻	649,5 [435,5;1044]	535,5 [447,5;618,5]	0,3194
CD8 ⁺ Naive	228,5 [122,8;381,3]	229,5 [198,5;327,8]	0,6264
CD8 ⁺ Memória Central	189,0 [97,20;279,3]	201,5 [108,8;222,0]	0,6886
CD8 ⁺ Memória Efetora	23,05 [6,58;72,43]	21,85 [8,50;25,93]	0,4808
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁺ d	14,20 [1,68;30,70]	14,65 [5,80;29,00]	0,9223
CD8 ⁺ Efetoras TD 27 ⁻	63,10 [15,43;273,3]	65,10 [42,53;88,45]	0,8236
CD4 ⁺ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁺	206,0 [121,3;401,5]	309,5 [187,8;444,0]	0,2664
CD4 ⁺ CD8 ⁻ /dim TCRgd ⁻	36,40 [25,63;55,83]	29,65 [27,25;32,83]	0,1454

Células NK	428,5 [354,8;929,3]	358,5 [281,0;709,5]	0,3194
Eosinófilos	189,0 [83,38;464,5]	130,5 [57,78;143,3]	0,0761
Neutrófilos	3633 [2601;5924]	3006 [1833;3704]	0,1781
Monócitos	799,5 [486,8;1127]	469,5 [156,3;686,5]	0,0240
Monócitos CD16 ⁺	48,30 [31,93;111,0]	74,05 [41,15;165,5]	0,4209
Células dendríticas plasmacitoides	26,35 [16,98;39,85]	16,15 [12,68;29,55]	0,2418
Basófilos	68,90 [60,98;122,2]	38,70 [16,8;73,40]	0,0164

Legenda: * Percentagem em relação à celularidade total. + positivo; - negativo; +d positivo fraco (*dim*). Mediana [Intervalo InterQuartil]. Teste Mann-Whitney

3.5 Caracterização dos perfis de diferenciação de células T e células NKT em doentes com DCF

As Tabelas 12, 13, 14 apresentam os resultados relativamente à caracterização das células NKT em percentagem parcial, ou seja, cada sub-população está representada relativamente à população correspondente.

A Tabela 12 apresenta os resultados gerais dos perfis de células T efectoras e NKT dos 24 doentes analisados.

Tabela 12: Resultados gerais dos perfis de células T efetoras e NKT dos 24 doentes analisados.

Perfis de células T CD4 efetoras	
Células Th1	21,54 (5,16)
Células Th1/Th17	7,85 (5,02)
Células Th17	10,88 (4,77)
Células Th2 + Treg	60.10 (11,67)
Perfis de células T CD8 efetoras	
Células Tc1	38,66 (11,21)
Células Tc1/Tc17	2,48 (1,50)
Células Tc17	6,92 (3,48)
Células Efetoras TD 27-	51,95 (12,00)
Perfis de células NKT	
iNKT CD4	54,45 (14,52)
iNKT CD8	33,62 (10,16)
iNKT DN	7,35 [3,85;13,18]

Legenda: Média (sd); Mediana [Intervalo InterQuartil].

3.6 Caracterização dos perfis de diferenciação de células T e células NKT em doentes com DCF com e sem história de STA

A Tabela 13 apresenta os resultados da caracterização das células NKT dos 24 doentes analisados com e sem STA e observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Tabela 13: Resultados da caracterização das células NKT dos 24 doentes analisados com e sem STA

Perfis de células T CD4 efetoras	Sem STA (n=16)	Com STA (n=8)	P-value
Células Th1	21,70 [18,10;26,58]	21,25 [18,30;24,55]	0,9642
Células Th1/Th17	6,60 [4,53;10,50]	6,50 [3,53;9,90]	0,6425
Células Th17	11,80 [7,60;14,43]	8,25 [6,55;10,63]	0,1089
Células Th2 + Treg	52,30 [42,95;60,38]	50,40 [43,00;64,53]	0,7990
Perfis de células T CD8 efetoras	Sem STA (n=16)	Com STA (n=8)	P-value
Células Tc1	38,85 [27,33;48,08]	35,50 [29,93;48,15]	0,8998
Células Tc1/Tc17	1,80 [1,43;3,10]	3,05 [1,28;3,60]	0,5173
Células Tc17	7,40 [4,55;8,98]	5,95 [3,58;8,55]	0,5181
Células Efetoras TD 27-	52,30 [42,95;60,38]	50,40 [43,00;64,53]	0,7990
Perfis de células NKT	Sem STA (n=16)	Com STA (n=8)	P-value
iNKT CD4	54,65 [47,93;67,43]	53,85 [39,45;61,58]	0,6306
iNKT CD8	30,55 [26,50;38,58]	37,80 [26,78;44,90]	0,3581
iNKT DN	7,40 [4,08;13,18]	6,10 [2,90;16,98]	0,6855

Legenda: Mediana [Intervalo InterQuartil]. Teste Mann-Whitney

3.7 Caracterização dos perfis de diferenciação de células T e células NKT em doentes com DCF com e sem instituição de terapêutica

A Tabela 14 apresenta os resultados da caracterização das células NKT dos 24 doentes analisados com e sem terapêutica e observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Tabela 14: Resultados da caracterização das células NKT dos 24 doentes analisados com e sem terapêutica

Perfis de células T CD4 efectoras	Sem Terapêutica (n=17)	Com Terapêutica (n=7)	P- value
Th2 + Treg	59,30 [48,90;69,10]	63,10 [60,70;67,60]	0,6097
Th1	22,10 [18,80;25,65]	20,10 [18,10;24,60]	0,7203
Th1/Th17	6,70 [3,95;10,50]	6,10 [4,50;10,20]	0,7934
Th17	11,60 [6,95;14,05]	9,50 [6,90;12,70]	0,6758
Perfis de células T CD8 efectoras	Sem Terapêutica (n=17)	Com Terapêutica (n=7)	P- value
Th2 + T reg	56,00 [44,35;65,10]	45,40 [42,20;55,90]	0.1711
Tc1	38,50 [27,05;48,90]	35,70 [34,20;46,80]	0,8012
Tc1/Tc17	1,80 [1,17;3,00]	3,60 [1,60;3,60]	0,3239
Tc17	6.40 [3,50;8,45]	7,80 [5,90;12,00]	0,1426
Células Efectoras TD 27-	56,00 [44,35;65,10]	45,40 [42,20;55.90]	0,1711
Perfis de células NKT	Sem Terapêutica (n=17)	Com Terapêutica (n=7)	P- value
iNKT CD4	54,90 [46,05;66,85]	54,40 [47,00;55,80]	0,8210
iNKT CD8	31,80 [27,00;38,25]	38,90 [24,40;49,80]	0.2666
iNKT DN	6,50 [3,30;16,00]	8,20 [3,80;8,50]	0.7446

Legenda: Mediana [Intervalo InterQuartil]. Teste Mann-Whitney

3.8 Estudo de mediadores séricos

Para este estudo foram utilizados sangues de 25 controlos saudáveis, do pool de doentes saudáveis analisados no laboratório de Imunologia. Os valores relativos à caracterização

demográfica da população de controlos saudáveis e do grupo de doentes analisados, relativamente às médias (e respetivo erro padrão) das idades e ao sexo dos dois grupos analisados encontram-se na Tabela 15. É de notar que não há diferenças estatisticamente significativas entre as idades e o sexo dos dois grupos.

Tabela 15: Caracterização demográfica da amostra controlo e do grupo de doentes, relativamente à média das idades e ao sexo.

	Doentes (n=25)	Controlos saudáveis (n=25)	P- value
Idade [anos]	9,68 (4,59)	9,68 (3,21)	0,8355*
Sexo			0,3961 [#]
Feminino	11	15	
Masculino	14	10	

Legenda: Media (sd)

* Teste Mann-Whitney

[#] Teste de Fisher

3.8.1 Estudo da proteína MBL – Lectina de ligação à manose (*Mannose Binding Lectin*)

A Tabela 16 apresenta os resultados obtidos (valores médios e respetivo desvio padrão) relativamente à quantificação da proteína MBL no soro de doentes e controlos saudáveis.

Observou-se claramente uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados, nomeadamente com o grupo de doentes a apresentar valores médios consideravelmente mais baixos do que o grupo de controlos saudáveis ($p=0,0214$), demonstrada também na figura 14.

Tabela 16: Resultados obtidos (valores médios e respetivo desvio padrão) relativamente à quantificação da proteína MBL no soro de doentes e controlos saudáveis

	Doentes (n=25)	Controlos (n=25)	P- value
MBL (ng/ml)	1501 (1563)	2351 (1868)	0,0214*

Legenda: Media (sd)

* Teste Mann-Whitney

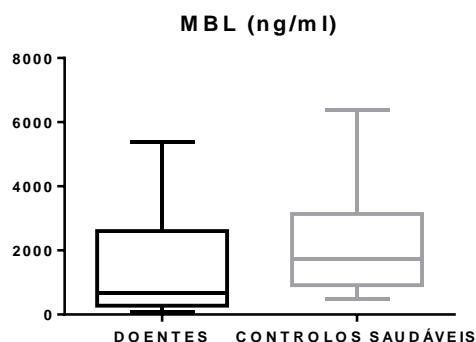


Figura 14: Quantificação da proteína MBL no soro de doentes e controlos saudáveis.

Uma vez mais, foi avaliada a população de doentes em função da história de STA e da terapêutica instituída, agora em relação aos níveis séricos de MBL.

Tal como se observa nas tabelas 17 e 18, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre doentes com e sem STA, e doentes com e sem terapêutica instituída em relação aos níveis séricos de MBL.

Tabela 17: Resultados obtidos (valores médios e respetivo desvio padrão) relativamente à quantificação da proteína MBL no soro de doentes com e sem STA

	Sem STA (n=16)	Com STA (n=9)	P-value
MBL (ng/ml)	1171 (1227)	2087 (1976)	0,4114*

Legenda: Media (sd)

* Teste Mann-Whitney

Tabela 18: Resultados obtidos (valores médios e respetivo desvio padrão) relativamente à quantificação da proteína MBL no soro de doentes com e sem terapêutica instituída.

	Sem Terapêutica (n=17)	Com Terapêutica (n=8)	P-value
MBL (ng/ml)	1549 (1678)	1397 (1387)	0,8076*

Legenda: Media (sd)

* Teste Mann-Whitney

3.8.2 Estudo da proteína CD40L

A Tabela 19 apresenta os resultados obtidos (valores médios e respetivo desvio padrão) relativamente à quantificação da proteína CD40L no soro de doentes e controlos saudáveis. Tal como o observado para a MBL, também para o CD40L se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos, com os doentes a apresentarem níveis significativamente mais elevados do que os controlos saudáveis ($p < 0,0001$), tal como se demonstra também na figura 15.

Tabela 19: Resultados obtidos (mediana e respetivo intervalo interquartil) relativamente à quantificação da proteína CD40L no soro de doentes e controlos saudáveis.

	Doentes (n=25)	Controlos (n=25)	P- value
CD40L (pg/ml)	2265 [1460;4304]	340 [160;1653]	<0,0001*

Legenda: Mediana [IQ]

* Teste Mann-Whitney

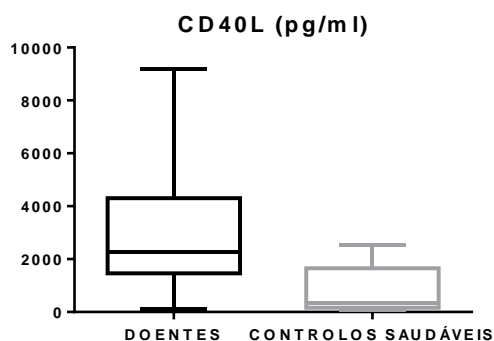


Figura 15: Quantificação da proteína CD40L no soro de doentes e controlos saudáveis.

A Tabela 20 apresenta os resultados obtidos relativamente à quantificação da proteína CD40L no soro dos doentes que apresentam ou não histórico de STA, não se observando nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Tabela 20: Resultados obtidos (mediana e respetivo intervalo interquartil) relativamente à quantificação da proteína CD40L no soro de doentes com e sem STA.

	Sem STA (n=16)	Com STA (n=9)	P-value
CD40L (pg/ml)	2148 [1184;3791]	2429 [2012;5480]	0,2747*

Legenda: Mediana [IQ]

* Teste Mann-Whitney

A tabela 21 apresenta os resultados obtidos relativamente à quantificação da proteína CD40L no soro dos doentes com e sem terapêutica, não se observando nenhuma alteração estatisticamente significativa entre os dois grupos.

Tabela 21: Resultados obtidos (mediana e respetivo intervalo interquartil) relativamente à quantificação da proteína CD40L no soro de doentes com e sem instituição da terapêutica.

	Sem Terapêutica (n=17)	Com Terapêutica (n=8)	P- value
CD40L (pg/ml)	2429 [1731;4405]	2040 [1291;3868]	0,5671*

Legenda: Mediana [IQ]

* Teste Mann-Whitney

4. Discussão e Conclusões

A Anemia Falciforme é uma das doenças monogénicas mais comuns no mundo (76). Estima-se que todos os anos aproximadamente 300.000 crianças nasçam com esta patologia, um número que poderá subir para 400.000 até 2050 (140). A esta hemoglobinopatia, em que ocorre classicamente a produção de Hemoglobina S (HbS), associam-se tipicamente fenómenos de hemólise crónica, mas também a ocorrência de eventos vaso-oclusivos e posterior lesão de órgãos (141).

Por outro lado, os indivíduos drepanocíticos têm uma tendência aumentada para infeções, que pode associar-se a diferentes níveis de comprometimento do seu sistema imunitário. De facto, do ponto de vista imunológico, esta doença tem vindo a ser relacionada com uma condição pro-inflamatória, associada por sua vez a alterações imunes fenotípicas e funcionais (90,142). De uma forma genérica, têm sido descritos nestes doentes um aumento da população de células T de memória, com marcadores de ativação celular, disfunção de células T reguladoras e aumento da função Th2 e Th17, bem como níveis elevados de PCR e de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Também são observadas alterações na função B, com perda sobretudo de células da zona marginal e diminuição da secreção de IgM (104,143–145).

Classicamente estes doentes apresentam uma redução das populações de linfócitos T CD4+ e CD8+, que poderão explicar o desequilíbrio na produção de citocinas, levando à predisposição para as infeções. Estudos recentes evidenciam ainda uma função B reguladora alterada, com níveis mais baixos de IL-10 e uma capacidade reduzida da inibição autónoma de TNF- α nos doentes que desenvolvem aloimunização, na sequência dos frequentes episódios de transfusão sanguínea a que são submetidos (104,143–145).

Tendo em conta a avaliação imunológica descrita na literatura, propusemo-nos avaliar o perfil imunológico da população pediátrica diagnosticada com Drepanocitose, seguida no Hospital D. Estefânia, em Lisboa. Nesse sentido, reconhecendo a mais-valia que o consórcio europeu EuroFlow tem trazido para a standardização da análise de diferentes populações celulares e diferentes patologias, através do desenvolvimento de protocolos de ensaio e estratégias de análise, decidimos aplicar neste estudo a estratégia recentemente definida para a abordagem de subpopulações celulares no diagnóstico de imunodeficiências primárias – o tubo PIDOT (138).

Para além das vantagens na uniformização de nomenclatura e de estratégias de identificação das subpopulações celulares, a análise com o tubo PIDOT já se encontra suportada por uma Base de Dados EuroFlow própria, que reúne informação de um pool muito significativo de doentes de toda a Europa, representativo de diferentes faixas etárias, o que permite assim uma avaliação e comparação dos nossos doentes perante uma base de dados bastante robusta e estandardizada. Esta abordagem, com aplicabilidade efetiva na rotina, permite a caracterização precisa de variadas populações de leucócitos normais, otimizando o tempo de análise, a sensibilidade diagnóstica bem como reduzindo a subjetividade inerente a este tipo de avaliação.

Na realidade, este estudo foi pioneiro na aplicação desta estratégia a uma população de doentes com Drepanocitose.

Para a generalidade dos doentes, as subpopulações celulares estudadas apresentaram-se dentro dos valores de referência apresentados pela Base de Dados EuroFlow para as respetivas faixas etárias. Ainda assim, doentes apresentaram valores aumentados ou diminuídos em relação a estes intervalos de referência, sendo de salientar que estas alterações ao nível das subpopulações de linfócitos traduziram na generalidade o que se encontra descrito na literatura. Curiosamente o grupo que apresentou menos alterações foi o grupo de doentes mais velhos, onde apenas houve a assinalar alteração numa pequena subpopulação de células T CD8+CD4- Efetoras com diferenciação terminal (as CD27+d). Apesar do número reduzido de doentes, estes resultados podem apontar para uma possível influência da idade no perfil imune dos doentes com Drepanocitose.

Em relação ao compartimento de células B, neste estudo, quando avaliadas as populações e subpopulações celulares de acordo com a Base de Dados EuroFlow, observaram-se alterações ainda que não tenha sido possível estabelecer a presença de um padrão de alterações constante em todos os doentes. Assim, identificaram-se concretamente diminuição das subpopulações de células B pós centro-germinativo *Unswitched* (CD27+ IgD+ IgM+), também chamadas de células B da zona marginal, e por outro lado, aumento de células B pré-centro germinativo e pós-centro germinativo com *Switch*. Estes resultados, ainda que sem um padrão completamente estabelecido em todos os doentes, vai ao encontro da literatura, podendo de alguma forma relacionar-se também com a

diminuição na secreção de IgM também descrita nestes doentes (115). De facto, níveis reduzidos de células B de memória IgM ($CD27^{+}IgM^{high}IgD^{low}$) têm sido descritos em doentes com hiposplenia ou asplenia, uma condição muito frequente também em doentes com Drepanocitose (114).

Uma análise similar pode ser efetuada quando abordamos a caracterização das células T e das suas subpopulações estudadas. Uma vez mais, o recurso aos valores de referência da Base de Dados EuroFlow permitiu encontrar alterações, ainda que não se tenham reproduzido em todos os doentes. Da análise dos nossos resultados foi possível identificar uma tendência para compartimentos T CD4 e T CD8 mais ricos em células de memória, nomeadamente células de memória central e células de memória efetoras, que parece ser independente da faixa etária dos doentes. Uma vez mais, estas observações vão ao encontro do que tem vindo a ser descrito na literatura, que aponta para o aumento das células T CD4⁺ de Memória Central como uma característica dos doentes com Drepanocitose (105,106).

Para as populações celulares definidas de acordo com a Base de Dados EuroFlow foram ainda avaliadas potenciais diferenças em doentes com e sem história de STA, bem como em doentes sob terapêutica ou não com Hidroxiureia.

História de STA nos doentes

Dentro do nosso grupo de doentes, quando divididos relativamente à ocorrência ou não de STA não se observaram quaisquer alterações relativamente às células dos compartimentos T, B e NK, nem no que se refere às restantes subpopulações de leucócitos estudadas.

Como se refere acima, parecem existir nos doentes com Drepanocitose características distintivas nas subpopulações circulantes de células B e T. Adicionalmente, estas alterações são mais evidentes quando se comparam doentes com Drepanocitose, com e sem registo de crises vaso-oclusivas. Concretamente, foram descritas diminuições na proporção de células T CD4⁺ e CD8⁺ em circulação nos doentes que apresentam crises vaso-oclusivas e defeitos esplénicos (106,107), e também que doentes com asplenia ou hiposplenia têm uma redução das suas células IgM de memória, ou seja as células pós

centro-germinativo sem *Switch* (92,114). Ainda que não se aborde especificamente a STA, os nossos resultados não estão em linha com os anteriormente descritos, uma vez que não há qualquer alteração a relatar. O facto de não se terem avaliado os doentes em situação de crise, isto é, no decurso de uma STA ativa, pode ser um dos motivos pelos quais não se identificaram estas alterações.

No entanto, no que diz respeito à presença ou não de história de STA, este estudo permitiu identificar uma subpopulação celular com diferenças estatisticamente significativas, quando se comparam doentes com e sem STA, nomeadamente a percentagem de células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Assim, em doentes com história de STA observaram-se níveis mais baixos desta população celular, em relação ao observado em doentes sem história de STA. Alterações em células dendríticas já foram reportadas em doentes com Drepanocitose. Assim, nestes doentes há um aumento de células dendríticas mieloides em circulação quando comparado com indivíduos saudáveis, ainda que não se reportem grandes alterações nas células dendríticas plasmacitoides. Contudo, em crise vaso-oclusiva, as células dendríticas mieloides parecem diminuir (146). Juntamente com os nossos dados, estas observações parecem apontar para uma relação entre estas manifestações de vaso-oclusão e STA, e uma diminuição das subpopulações de células dendríticas em circulação. Por outro lado, quando pesquisadas em estudos relacionados com outras complicações a nível de infeção respiratória, como foi o caso do Síndrome Respiratório Agudo Grave, na primeira semana da doença, as células dendríticas plasmacitoides e mieloides encontram-se reduzidas na circulação quando comparados com controlos saudáveis, restabelecendo valores normais durante a convalescença (147).

As células dendríticas desempenham um papel importante durante a infeção e inflamação pulmonar, migrando nestes casos para o pulmão onde promovem e regulam a resposta imune local (148). Posto isto, a diminuição destas células poderá ser resultante de um padrão de migração diferencial para os tecidos no contexto de infeção ou nos doentes com STA. Mais ainda, sabe-se que a STA é uma causa frequente de doença pulmonar aguda em crianças drepanocíticas também associada a infeções pulmonares virais ou bacterianas (149,150). Por outro lado, as células dendríticas plasmacitoides são dos principais intervenientes nas respostas antivirais, através da produção de uma grande quantidade de IFN tipo I (IFN- α e IFN- β) (151), o que pode estar a favor desta migração diferencial.

Da literatura é possível identificar também estudos que reportam que as células iNKT estão implicadas na ocorrência das crises vaso-oclusivas. Estas células, produtoras de citocinas pró-inflamatórias (110), estão aumentadas nos doentes com Anemia Falciforme, quando comparados com controlos saudáveis, e mais ainda apresentam níveis de ativação mais elevados nestes doentes (111,112). Neste estudo, estas células foram avaliadas nos doentes em função da existência ou não de história de STA não se tendo verificado quaisquer alterações, em qualquer das subpopulações estudadas. Uma vez mais, a avaliação destas células em doentes com STA poderá ajudar a esclarecer o seu papel neste contexto.

Influência da terapêutica com Hidroxiureia em doentes com Drepanocitose

Na avaliação do perfil imune dos doentes com Drepanocitose em função da instituição ou não da terapêutica já se observam diferenças estatisticamente significativas em várias populações celulares.

Relativamente à terapêutica instituída nestes doentes, a Hidroxiureia, sabe-se que existem algumas alterações características apontadas pela literatura, nomeadamente os seus maiores benefícios são atribuídos à sua capacidade de aumentar a concentração de HbF (130) e à capacidade de promover a diminuição de leucócitos circulantes (133–135). Também estão associadas à terapêutica com Hidroxiureia reduções ao nível das contagens de linfócitos, nomeadamente nas células T de memória em circulação (90,136).

Considerando o papel descrito para Hidroxiureia em relação ao aumento dos níveis de HbF, seria de esperar que se observassem diferenças entre doentes com e sem terapêutica. No entanto, nos doentes deste estudo não se observaram quaisquer diferenças nesse sentido.

Em relação à instituição de terapêutica são de realçar as diferenças observadas ao nível dos valores absolutos de células T CD4 de Memória Central e de Memória Efetoras. Em concreto, identificaram-se valores absolutos mais elevados em doentes que não têm terapêutica instituída. Com base na literatura, o aumento desta população celular é característico dos doentes drepanocíticos. Assim, os nossos resultados sugerem que a

introdução de terapêutica poderá ter como efeito a redução desta população de células T mais diferenciadas. Estudos anteriores realizados em doentes com Drepanocitose com e sem terapêutica de Hidroxiureia demonstraram que a percentagem de células T $CD4^+CD28^{\text{null}}$, células efetoras diferenciadas também se encontra diminuída em doentes com terapêutica instituída (102).

Entre doentes com e sem terapêutica, observaram-se alterações ao nível da percentagem das células T $TCR\gamma\delta$, especificamente com valores mais elevados nos doentes com terapêutica instituída. Estas células não foram ainda particularmente estudadas no âmbito da Drepanocitose mas de acordo com a literatura sabe-se que desempenham um papel importante nas fases iniciais de uma infeção, podendo assim estabelecer uma ligação entre as respostas imunes inatas e adaptativas através da secreção de citocinas e da sua atividade citotóxica (152,153). Posto isto, sabe-se também que a instituição da Hidroxiureia nos doentes drepanocíticos está diretamente relacionada com a severidade da doença, sendo instituída nos doentes com quadros clínicos mais complicados, incluindo a predisposição para a ocorrência de infeções (154,155). Assim sendo, o efeito benéfico da Hidroxiureia pode passar também pela promoção das células T gama-delta melhorando a capacidade de resposta a infeções nestes doentes.

Tanto os Monócitos como os Basófilos apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparámos doentes com ou sem terapêutica instituída, apresentando valores mais elevados em doentes sem terapêutica. Aliás, os valores absolutos de leucócitos apresentaram no geral esta tendência. Estes resultados vêm no seguimento do que se sabe da literatura. Isto é, a Hidroxiureia é utilizada na Drepanocitose, e com bastante eficiência, para a diminuição dos valores de leucócitos circulantes (133–135), o que se traduz também nos nossos resultados. De facto, sabe-se que as diminuições nas contagens de neutrófilos, monócitos e eritrócitos, secundárias à instituição da terapêutica com Hidroxiureia, estão diretamente associadas a reduções nas taxas de crises de 3 meses (156).

Por um lado, está descrito que nos doentes drepanocíticos há uma ativação dos monócitos, que leva ao aumento de crises vaso-oclusivas através da promoção da resposta inflamatória endotelial. (79). Portanto, a monocitose característica dos doentes com Drepanocitose é contrariada pela introdução de terapêutica com Hidroxiureia, que

promoverá assim uma diminuição destas células com repercussão na qualidade de vida dos doentes.

O aumento de monócitos e basófilos em doentes sem terapêutica poderá ser mais um indicador do estadio pro-inflamatório que é assumido nestes doentes. Neste estudo não foram realizadas avaliações funcionais, por exemplo abordando a produção de citocinas pro-inflamatórias, que podem ter impacto em diversas populações celulares. Por exemplo, podem relacionar-se com as respostas Th1/Th2. Neste contexto, Vingert e colaboradores reportaram uma diminuição na secreção de citocinas de resposta Th1, como IFN- γ e IL-2, em doentes com Anemia Falciforme (105). Porém, a resposta Th2, através da elevada secreção de IL-4, parece ligar-se com a ocorrência de crises vaso-oclusivas (104,107).

O facto de se identificarem diferenças ao nível das populações celulares em doentes com e sem terapêutica, poderá vir a ser relevante do ponto de vista da monitorização da eficácia da terapêutica no contexto da resposta imune. Ainda que estes resultados precisem de ser confirmados e fortalecidos com estudos de maiores dimensões.

Estudo dos mediadores séricos (MBL e CD40L)

Os doentes drepanocíticos apresentam suscetibilidade a infeções devido ao comprometimento do seu sistema imunitário e para além de alterações já conhecidas no sistema imunitário inato, também têm sido evidenciadas alterações características da imunidade adaptativa mais especificamente ao comportamento das células T (104–106), como se abordou anteriormente. Contudo, estes elementos não parecem ser suficientes para explicar esta ligação. Assim, outros mediadores imunes têm vindo a ser estudados neste contexto, como é o caso da MBL.

Neste estudo foi avaliada a concentração de MBL no soro da população com Drepanocitose, em comparação com uma população pediátrica de controlos saudáveis, apresentando os doentes níveis séricos mais baixos. Tendo em conta a função desta proteína enquanto recetor da resposta inata e enquanto elemento de ativação do sistema do complemento, a sua diminuição na Drepanocitose pode ser uma das razões pelas quais estes doentes apresentam maior suscetibilidade a infeções (157). De facto, vários estudos em Drepanocitose têm vindo a avaliar a existência de polimorfismos no gene da MBL.

Estudos confirmam que o alelo variante para a MBL2 associado a baixos níveis de MBL contribui para a fisiopatologia da Anemia Falciforme (118,158). Para reforçar ainda mais a ideia sabe-se que a diminuição dos níveis séricos de MBL está associada à frequência de eventos vaso-oclusivos em indivíduos com Anemia Falciforme (119).

No nosso estudo não se verificaram alterações nestes níveis quando se compararam doentes com e sem STA, e doentes com e sem terapêutica. Tal poderá ser explicado pelo facto de nestes doentes não estar a ocorrer STA ativa e pelo facto de eventualmente a terapêutica não interferir com esta molécula

Por outro lado, outro elemento que pode ser relevante no contexto da doença, tendo em conta que se têm descrito alterações nos linfócitos T e B, é a proteína CD40L. De facto, esta molécula é crucial para a interação entre os linfócitos T e B, e para a troca de isótipo nas respostas humorais. Neste estudo, observámos que os níveis séricos de doentes com Drepanocitose são superiores aos apresentados por controlos saudáveis.

Estes resultados eram expectáveis reconhecendo o potencial pró-inflamatório que esta molécula apresenta, com o seu efeito ativador em células endoteliais, e bem como o que tem vindo a ser descrito em doentes com Drepanocitose (126). Ou seja os nossos resultados estão em concordância com a literatura, pois no geral, em doenças que envolvem inflamação vascular, os níveis de CD40L encontram-se aumentados (125), particularmente no que se refere a doentes drepanocíticos (126).

Feitas todas as avaliações celulares inicialmente propostas, é de salientar que neste grupo particular de doentes não se observa um perfil imune característico, apenas uma tendência para as alterações que têm vindo a ser descritas na literatura. De facto, embora tenham vindo a ser reconhecidas alterações características em doentes drepanocíticos, na população aqui estudada não se encontrou propriamente um padrão de alterações específico, comportando-se aliás esta população de uma maneira bastante heterogénea.

Em relação à ocorrência de episódios de Síndrome Torácica Aguda nestes doentes, apenas a população de células dendríticas plasmacitoides apresentou diferenças em doentes com e sem STA, o que pode vir a representar no futuro um possível elemento a considerar o ponto de vista de marcadores de risco para este tipo de eventos. Contudo a avaliação dos doentes no período em que desenvolvem STA poderá ajudar a esclarecer o papel destas

células. Em paralelo, a avaliação de um número maior de doentes poderá também robustecer as observações do presente estudo. Serão ainda necessários mais estudos para melhor se compreender a contribuição do sistema imune nas manifestações de carácter inflamatório e infeccioso no doente drepanocítico, bem como depois avaliar a resposta a vacinas ou os processos que levam à aloimunização, que não foram abordados neste estudo.

Já no que diz respeito à instituição da terapêutica, foram identificadas alterações que vão ao encontro da literatura, nomeadamente a observação do aumento de células T CD4⁺ Memória Central e células T CD4⁺ de Memória Efetora, bem como o aumento de Monócitos e Basófilos. Estes elementos, devidamente confirmados em estudos com maior número de indivíduos, poderão vir a ter aplicação futura por exemplo na monitorização da terapêutica, do ponto de vista da resposta imune.

Relativamente à avaliação dos níveis séricos dos mediadores imunes MBL e CD40L, os resultados foram os esperados, de acordo com a literatura em doentes drepanocíticos, nomeadamente uma diminuição e um aumento, respetivamente, quando comparados com controlos saudáveis. A sua correlação e associação com as populações celulares estudadas poderão também vir a revelar padrões importantes para uma melhor compreensão do perfil imune em doentes com Drepanocitose.

Quanto a limitações, reconhecemos que este estudo apresenta um número de amostras relativamente reduzido. Por outro lado, os nossos resultados beneficiariam ainda de uma população mais abrangente, recolhida de vários centros de acompanhamento de doentes, e não apenas de um único centro hospitalar, como foi possível neste estudo.

Em conclusão, destacamos o carácter pioneiro do estudo no que se refere à aplicação das estratégias EuroFlow no contexto do doente com Drepanocitose, e em paralelo, a sua possível aplicabilidade em termos de acompanhamento clínico dos doentes, em relação à STA e à terapêutica.

Como perspetivas futuras esperamos estabelecer a partir daqui um estudo prospetivo, com uma população mais alargada que possa confirmar e complementar as observações deste trabalho.

5. Referências Bibliográficas

1. Cruvinel WDM, Júnior DM, Araújo JAP, Catelan TTT, de Souza AWS, da Silva NP, et al. Immune system - part I fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. Vol. 50, Revista Brasileira de Reumatologia. 2010. p. 443–61.
2. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Vol. 357, Lancet. 2001. p. 1777–89.
3. Medzhitov R, Janeway C. Innate Immunity. N Engl J Med. 2000;343:338–44.
4. Delves PJ, Roitt IM. The Immune System: First of Two Parts. October. 2000;343(1):37–50.
5. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. Nat Immunol. 2016;17(1):9–17.
6. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and Functions of Tissue Macrophages. Immunity. 2014;41(1):21–35.
7. Rothlin C V., Carrera-Silva EA, Bosurgi L, Ghosh S. TAM Receptor Signaling in Immune Homeostasis. Annu Rev Immunol. 2015;33:355–91.
8. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Vol. 124, Cell. 2006. p. 783–801.
9. Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. Immunol Rev. 2005;204:27–42.
10. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. 2004;430(July).
11. Bowie A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol. 2000;67(4):508–14.
12. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. Nat Immunol [Internet]. 2010;11(5):373–84.

Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1863>

13. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819–26.
14. Mellman I, Steinman RM. Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines. 2001;106:255–8.
15. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor–dependent Long-Term Cultures. *J Exp Med*. 1997;185(2):317–28.
16. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767–811.
17. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* (80-). 2010;327(5966):656–61.
18. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657–70.
19. Burg ND, Pillinger MH. The neutrophil: Function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol*. 2001;99(1):7–17.
20. Gleich GJ, Loegering DA. Immunobiology of eosinophils. *Annu Rev Immunol*. 1984;2(1):429–59.
21. Galli SJ, Kalesnikoff J, Grimbaldston MA, Piliponsky AM, Williams CMM, Tsai M. Mast Cells as “Tunable” Effector and Immunoregulatory Cells: Recent Advances. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):749–86.
22. Sullivan BM, Locksley RM. Basophils: A Nonredundant Contributor to Host Immunity. Vol. 30, *Immunity*. 2009. p. 12–20.
23. Schroeder JT, Macglashan DW, Lichtenstein LM. Human basophils: Mediator release and cytokine production. *Adv Immunol*. 2001;77:93–122.
24. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells: In health and disease. Vol. 118, *Clin Immunol*. 2006. p. 1–10.

25. Cerwenka A, Lanier LL. Natural Killer Cells, Viruses and Cancer. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):41.
26. Okeke T, Musa B, Babadoko A, Jamoh B. Complement Levels in Nigeria Patients with Sickle Cell Anaemia in the Asymptomatic State. *Niger J Clin Pract.* 2018;21(9):1139–43.
27. Battersby, A. J., Knox-Macaulay, H. H., & Carrol, E. D. (2010). Susceptibility to invasive bacterial infections in children with sickle cell disease. *Pediatric blood & cancer*, 55(3), 401-406.
28. Ehrnthaller C, Ignatius A. New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med.* 2011;17(3–4):1.
29. Manuscript A. Complement-targeted therapeutics. 2010;25(11):1265–75.
30. Uszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP. Control of the Complement System. 1996;2776:201–83.
31. Turner MW. Mannose-binding lectin: The pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today.* 1996;17(11):532–40.
32. Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med.* 1989;170(4):1175–89.
33. Turner MW. Mannose binding protein. *Biochem Soc Trans.* 1994;22(1):88–94.
34. Jenkinson EJ, Jenkinson WE, Rossi SW, Anderson G. The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch? *Nat Rev Immunol.* 2006;6(7):551–5.
35. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S33–40.
36. Golubovskaya V, Wu L. Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2016;8(3).
37. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and

- Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity*. 2007;27(3):393–405.
38. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG, Medicine G, Hospital HM. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine*. 2015;74(1):5–17.
 39. Mosmann VR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 2016;136(7):2348–57.
 40. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;
 41. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. *The Biology of NKT Cells*. 2007;
 42. Dasgupta S, Kumar V. Type II NKT cells : a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset. *Immunogenetics* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-016-0930-1>
 43. Exley MA, Wilson SB, Balk SP. Isolation and Functional Use of Human. 2017;(November):1–20.
 44. Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. Requirements for CD1d Recognition by Human Invariant V α 24+ CD4– CD8– T cells. *J Exp Med*. 1997;186(1).
 45. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 SUPPL. 2):S33–40.
 46. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(202):S41–52.
 47. Orduño NM, Grimaldi C, Diamond B. B Cells. Tenth Edit. *Kelley’s Textbook of Rheumatology*. Elsevier Inc.; 2013. 191-214 p.
 48. Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, et al. Standardizing Flow Cytometry Immunophenotyping Analysis from the Human ImmunoPhenotyping Consortium. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2016;(January):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20686>

49. Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, et al. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int* [Internet]. 2018;67(1):43–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2017.06.003>
50. Oliveira JB, Fleisher TA. Molecular- and Flow Cytometry-based Diagnosis of Primary Immunodeficiency Disorders. 2010;460–7.
51. Donnell EAO, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter Flow Cytometry : Advances in High Resolution Analysis. 2013;13(2):43–54.
52. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163–76.
53. Jagani H, Kumar A, Gang SS, Hebbar K, Talwar S. Flow Cytometry : Basic Principle and Applications in Biotechnology and Pharmacy. 2009;683:659–83.
54. Willmann K, Dunne JF. A flow cytometric immune function assay for human peripheral blood dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2000;
55. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat Rev Immunol*. 2012;140(2):177–83.
56. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo ECY, Quek JKS, Yong HX, et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(September). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep34310>
57. Watzl C. Natural killer cells, viruses and cancer. *Int J Probiotics Prebiotics*. 2008;3(3):141–5.
58. Béziat V, Duffy D, Quoc SN, Garff-tavernier M Le, Decocq J, Debré P, et al. CD56 bright CD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *J Immunol*. 2011;
59. Ziegler-Heitbrock H, Ströbel M, Fingerle G, Schlunck T, Pforte A, Blumenstein M, et al. Small (CD14+/CD16+) Monocytes and Regular Monocytes in Human Blood. *Pathobiology*. 1991;59:127–30.

60. Akbar a N, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol.* 1988;140(7):2171–8.
61. Sallusto F, Lenig D, Forste R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401.
62. Tussey L, Speller S, Gallimore A, Vessey R. Functionally distinct CD8 + memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. 2000;1823–9.
63. Yamamoto J, Adachi Y, Onoue Y, Adachi YS, Okabe Y, Itazawa T, et al. Differential expression of the chemokine receptors by the Th1- and Th2-type effect or populations within circulating CD4+ T cells. *J Leukoc Biol [Internet].* 2000;68(4):568–74. Available from: <http://www.jleukbio.org/content/68/4/568.abstract>
64. Agematsu K, Nagumo H, Yang F-C, Nakazawa T, Fukushima K, Ito S, et al. B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol.* 1997;2073–9.
65. EuroFlow™ Consortium [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: www.euroflow.org
66. Cytognos S.L. [Internet]. [cited 2018 Dec 5]. Available from: www.cytognos.com
67. WHO. Sickle cell anaemia. A report of the 59th World Health Assembly. 2006;(April):1–5.
68. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. *Jama.* 2001;312(10):1063.
69. Therrell BL, Lloyd-Puryear MA, Eckman JR, Mann MY. Newborn screening for sickle cell diseases in the United States: A review of data spanning 2 decades. *Semin Perinatol.* 2015 Apr;39(3):238–51.

70. Ingram VM. Gene mutations in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin. *Nature*, 1957; 180:4581: 326-328.
71. Pauling L, Itano HA. Sickle cell anemia a molecular disease. *Science*, 1949; 110:543-548.
72. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ*. 2008;86(6):480-7.
73. Bunn HFRB. Pathogenesis and Treatment of Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 1997;337(11):762-9.
74. Lonergan GJ, Cline DB, Abbondanzo SL. Sickle Cell Anemia. In: *Radiographics*. 2001. p. 429-31.
75. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, et al. Significant haemoglobinopathies: Guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol*. 2010;149(1):35-49.
76. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2010;376(9757):2018-31.
77. Turhan A, Weiss LA, Mohandas N, Collier BS, Frenette PS. Primary role for adherent leukocytes in sickle cell vascular occlusion: A new paradigm. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99(5):3047-51.
78. Frenette PS. Sickle Cell Vasoocclusion: Heterotypic, Multicellular Aggregations Driven by Leukocyte Adhesion. *Microcirculation*. 2004 Jan;11(2):167-77.
79. Belcher JD, Marker PH, Weber JP, Hebbel RP, Vercellotti GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. *Blood J [Internet]*. 2000;96(7):2451-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001897>
80. Bussel JB, Berkowitz RL, McFarland JG, Lynch L, Chitkara U. Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med*. 1991;319(21):1374-8.
81. Platt OS, Brambilla DJ, Rose WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, et al. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early death. *N*

- Engl J Med. 1994;330(23):1634–44.
82. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 2000;342(25):1855–65.
83. Gladwin MT, Vichinsky E. Pulmonary Complications of Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 2008;359:2254–65.
84. Vichinsky EP, Neumayr LD, Earles AN, Williams R, Lennette ET, Dean D, et al. Causes and Outcomes of the Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 2000;342(25):1855–65.
85. DeBaun MR, Rodeghier M, Cohen R, Kirkham FJ, Rosen CL, Roberts I, et al. Factors predicting future ACS episodes in children with sickle cell anemia. Am J Hematol. 2014;89(11):E212–7.
86. Vichinsky E, Williams R, Da M, Earles AN, Lewis N, Adler A, et al. Pulmonary Fat Embolism: A Distinct Cause of Severe Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Anemia. J Am Soc Hematol. 1994;83(6):1689–95.
87. Castro O, Brambilla DJ, Thorington B, Reindorf CA, Scott RB, Gillette P, et al. The Acute Chest Syndrome in Sickle Cell Disease: Incidence and Risk Factors. Blood [Internet]. 1994;84(2):643–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/84/2/643.full.pdf>
88. Howard J, Malfroy M, Llewelyn C, Choo L, Hodge R, Johnson T, et al. The Transfusion Alternatives Preoperatively in Sickle Cell Disease (TAPS) study: A randomised, controlled, multicentre clinical trial. Lancet [Internet]. 2013;381(9870):930–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61726-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61726-7)
89. Vichinsky EP, Styles L a, Colangelo LH, Wright EC, Castro O, Nickerson B. Acute chest syndrome in sickle cell disease: clinical presentation and course. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. Blood [Internet]. 1997;89(5):1787–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9057664>
90. Nickel RS, Osunkwo I, Garrett A, Robertson J, Archer DR, Promislow DEL, et

- al. Immune parameter analysis of children with sickle cell disease on hydroxycarbamide or chronic transfusion therapy. *Br J Haematol*. 2015;169(4):574–83.
91. Barrett-Connor E. Bacterial infection and sickle cell anemia: an analysis of 250 infections in 166 patients and a review of the literature. *Medicine*. 1971; 50.2: 97-112.
92. Brousse V, Buffet P, Rees D. The spleen and sickle cell disease: The sick(led) spleen. *Br J Haematol*. 2014;166(2):165–76.
93. William BM, Corazza GR. Hyposplenism: a comprehensive review. Part I: basic concepts and causes. *Hematology*, 2007; 12.1: 1-13.
94. Pearson HA, McIntosh S, Ritchey AK, Lobel JS, Rooks Y, Johnston D. Developmental aspects of splenic function in sickle cell diseases. *Blood*, 1979; 53.3: 358-365.
95. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(8):606–16.
96. Rosado MM, Gesualdo F, Marcellini V, Di Sabatino A, Corazza GR, Smacchia MP, et al. Preserved antibody levels and loss of memory B cells against pneumococcus and tetanus after splenectomy: Tailoring better vaccination strategies. *Eur J Immunol*. 2013;43(10):2659–70.
97. Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordie C, Conley ME. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104(12):3647–54.
98. Adamkiewicz T V., Sarnaik S, Buchanan GR, Iyer R V., Miller ST, Pegelow CH, et al. Invasive pneumococcal infections in children with sickle cell disease in the era of penicillin prophylaxis, antibiotic resistance, and 23-valent pneumococcal polysaccharide va. *J Pediatr*. 2003;143(4):438–44.
99. Davies EG, Hirst C, Lottenberg R, Dower N. Pneumococcal vaccines for sickle cell disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(1):2–4.

100. Platt OS. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. *J Clin Invest.* 2000;106(3):337–8.
101. Leikin SL, Gallagher D, Kinney TR, Sloane D, Klug P, Rida W. Mortality in children and adolescents with sickle cell disease. Cooperative Study of Sickle Cell Disease. *Pediatrics.* 1989;84(3):500–8.
102. Saleh Elalfy M, Abdel A, Adly M, Soliman F, Ebeid E, Samir Eissa D, et al. Immunological role of CD4 + CD28 null T lymphocytes, natural killer cells, and interferon-gamma in pediatric patients with sickle cell disease: relation to disease severity and response to therapy. *Immunol Res.* 2018;
103. Balandya E, Reynolds T, Aboud S, Obaro S, Makani J. Increased memory phenotypes of CD4+ and CD8+ t cells in children with sickle cell anaemia in Tanzania. *Tanzan J Health Res.* 2017;19(2):1–12.
104. Balandya E, Reynolds T, Obaro S, Makani J. Alteration of lymphocyte phenotype and function in sickle cell anemia: Implications for vaccine responses. *Am J Hematol.* 2016;91(9):938–46.
105. Vingert B, Tamagne M, Habibi A, Pakdaman S, Ripa J, Elayeb R, et al. Phenotypic differences of CD4⁺ T cells in response to red blood cell immunization in transfused sickle cell disease patients. *Eur J Immunol.* 2015;45(6):1868–79.
106. Koffi KG, Sawadogo D, Meite M, Nanho DC, Tanoh ES, Attia AK, et al. Reduced levels of T-cell subsets CD4 + and CD8 + in homozygous sickle cell anaemia patients with splenic defects. *Hematol J.* 2003;4(5):363–5.
107. Musa BOP, Onyemelukwe GC, Hambolu JO, Mamman AI, Isa AH. Pattern of serum cytokine expression and T-Cell subsets in sickle cell disease patients in vaso-occlusive crisis. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(4):602–8.
108. Sarray S, Saleh LR, Lisa Saldanha F, Al-Habboubi HH, Mahdi N, Almawi WY. Serum IL-6, IL-10, and TNF α levels in pediatric sickle cell disease patients during vasoocclusive crisis and steady state condition. *Cytokine* [Internet]. 2015;72(1):43–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.11.030>

109. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad STO, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2009;85(2):235–42. Available from: <http://www.jleukbio.org/cgi/doi/10.1189/jlb.0708445>
110. Field JJ. Can selectin and iNKT cell therapies meet the needs of people with sickle cell disease? *Hematology*. 2015;2015(1):426–32.
111. Wallace KL, Linden J. Adenosine A2A receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease. Vol. 116, *Blood*. 2010. 1510-1520 p.
112. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN- γ and CXCR3 chemokines. *Blood*. 2009;114(3):667–76.
113. Booth C, Inusa B, Obaro SK. Infection in sickle cell disease: A review. *Int J Infect Dis*. 2010;14(1):2–12.
114. Cameron PU, Jones P, Gorniak M, Dunster K, Paul E, Lewin S, et al. Splenectomy associated changes in IgM memory B cells in an adult spleen registry cohort. *PLoS One*. 2011;6(8).
115. Rautonen N, Martin NL, Rautonen J, Rooks Y, Mentzer WC, Wara DW. Low number of antibody producing cells in patients with sickle cell anemia. *Immunol Lett*. 1992;34(3):207–11.
116. Janoff EN, Rubins JB. Invasive Pneumococcal Disease in the Immunocompromised Host. 1997;3(3).
117. Wilson WA, Hughes GR V, Lachmann PJ. Deficiency of factor B of the complement system in sickle cell anaemia. *Br Med J*. 1976;1(6006):367–9.
118. Oliveira MCVC, Mendonça TF, Vasconcelos LRS, Moura P, Bezerra MAC, Santos MNN, et al. Association of the MBL2 gene EXON1 polymorphism and vasoocclusive crisis in patients with sickle cell anemia. *Acta Haematol*.

- 2009;121(4):212–5.
119. Medeiros FS, de Mendonça TF, Lopes KA de M, França LM da C, da Silva AS, Vasconcelos LRS, et al. Combined genotypes of the MBL2 gene related to low mannose-binding lectin levels are associated with vaso-occlusive events in children with sickle cell anemia. *Genet Mol Biol.* 2017;40(3):600–3.
120. Neonato MG, Lu CY, Guilloud-Bataille M, Lapoumériou C, Nabeel-Jassim H, Dabit D, et al. Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: Identification of three new variant alleles and relationship to infections. *Eur J Hum Genet.* 1999;7(6):679–86.
121. Oliveira MCVC, Mendonça TF, Vasconcelos LRS, Moura P, Bezerra MAC, Santos MNN, et al. Association of the MBL2 gene EXON1 polymorphism and vasoocclusive crisis in patients with sickle cell anemia. *Acta Haematol.* 2009;121(4):212–5.
122. Mendonça TF, Oliveira MCVC, Vasconcelos LRS, Pereira LMMB, Moura P, Bezerra MAC, et al. Association of variant alleles of MBL2 gene with vasoocclusive crisis in children with sickle cell anemia. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2010;44(4):224–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.02.004>
123. Madsen EC, Levy ER, Madden K, Agan AA, Sullivan RM, Graham DA, et al. Mannose-Binding Lectin Levels in Critically Ill Children with Severe Infections. 2017;18(11):3107–12.
124. Armitage RJ, Sato TA, Macduff BM, Clifford KN, Alpert AR, Smith CA, et al. Identification of a source of biologically active CD40 ligand. *Eur J Immunol.* 1992;22(8):2071–6.
125. Younes A, Snell V, Consoli U, Clodi K, Zhao S, Palmer JL, et al. Elevated levels of biologically active soluble CD40 ligand in the serum of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1998;100(1):135–41.
126. Lee SP, Ataga KI, Orringer EP, Phillips DR, Parise L V. Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: Potential role for platelet-mediated

- inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(7):1626–31.
127. Garrido VT, Proença-Ferreira R, Dominical VM, Traina F, Bezerra MAC, de Mello MRB, et al. Elevated plasma levels and platelet-associated expression of the pro-thrombotic and pro-inflammatory protein, TNFSF14 (LIGHT), in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2012;158(6):788–97.
 128. Steinberg MH. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *Sci World J.* 2009;9:46–67.
 129. Knowles A. Hydroxyurea Enhances Fetal Hemoglobin Production in Sickle Cell Anemia. *Nat New Biol.* 1984;236(68):202–3.
 130. De W, Charache BS, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia [see comments]. *Blood.* 1992;79(1):2555–65.
 131. Styles LA, Lubin B, Vichinsky E, Lawrence S, Hua M, Test S, et al. Decrease of Very Late Activation Antigen-4 and CD36 on Reticulocytes in Sickle Cell Patients Treated With Hydroxyurea. *Blood [Internet].* 1997;89(7):2554–9. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/89/7/2554.abstract>
 132. Saleh AW, Hillen HFP, Duits AJ. Levels of endothelial, neutrophil and platelet-specific factors in sickle cell anemia patients during hydroxyurea therapy. *Acta Haematol.* 1999;102(1):31–7.
 133. Conran N, Saad STO, Costa FF, Ikuta T. Leukocyte numbers correlate with plasma levels of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in sickle cell disease. *Ann Hematol.* 2007;86(4):255–61.
 134. Wang WC, Ware RE, Miller ST, Iyer R V, Casella JF, Minniti CP. A multicenter randomised controlled trial of hydroxyurea (hydroxycarbamide) in very young children with sickle cell anaemia. *Lancet.* 2011;377(9778):559–72.
 135. Yahouédéhou SCMA, Carvalho MOS, Oliveira RM, Santiago RP, Da Guarda CC, Carvalho SP, et al. Sickle Cell Anemia Patients in Use of Hydroxyurea: Association between Polymorphisms in Genes Encoding Metabolizing Drug Enzymes and Laboratory Parameters. *Dis Markers.* 2018;2018.

136. Lederman HM, Connolly MA, Kalpatthi R, Ware RE, Wang WC, Luchtman-Jones L, et al. Immunologic Effects of Hydroxyurea in Sick Cell Anemia. *Pediatrics* [Internet]. 2014;134(4):686–95. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-0571>
137. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013;310(20):2191–4.
138. Velden VHJ Van Der, Flores-montero J, Perez-andres M, Martin-ayuso M, Crespo O, Blanco E, et al. Optimization and testing of dried antibody tube : The EuroFlow LST and PIDOT tubes as examples. *J Immunol Methods* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2017.03.011>
139. Martins C, Toader I, Nunes G, Lopes MT, Borrego LM. Application of bulk lysis protocol for the evaluation of rare immune subsets: - profile of iNKT cells in SCD. POSTER aceite por ESCCA - European society for clinical cell analysis; 2018.
140. Hay SI, Gupta S, Weatherall DJ, Williams TN. Global Burden of Sick Cell Anaemia in Children under Five , 2010 – 2050 : Modelling Based on Demographics , Excess Mortality , and Interventions. 2013;10(7).
141. Belcher JD, Chen C, Nguyen J, Milbauer L, Abdulla F, Alayash AI, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014;123(3):377–91.
142. Holtzclaw JD, Jack D, Aguayo SM, Eckman JR, Roman J, Hsu LL. Enhanced Pulmonary and Systemic Response to Endotoxin in Transgenic Sick Mice. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2004;169(6):687–95. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200302-224OC>
143. Proença-Ferreira R, Brugnerotto AF, Garrido VT, Dominical VM, Vital DM, Ribeiro MFR, et al. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS One*. 2014;9(2):20–2.
144. Bao W, Zhong H, Manwani D, Vasovic L, Uehlinger J, Margaret T, et al.

- Regulatory B cell Compartment in Transfused Alloimmunized and Non-alloimmunized Patients with Sickle Cell Disease. *Am J Hematol*. 2013;88(9):736–40.
145. Makis AC, Hatzimichael EC, Bourantas KL. The role of cytokines in sickle cell disease. *Ann Hematol*. 2000;79(8):407–13.
 146. Lin G, Yu JC, Field JJ, Nathan DG, Linden J. Human Sickle Cell Disease Increases Numbers and Activation Of Peripheral Blood Myeloid Dendritic Cells, Monocytes, and Neutrophils. *Blood* [Internet]. 2013; Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/1033.short>
 147. Zhang Z, Xu D, Li Y, Jin L, Shi M, Wang M, et al. Longitudinal alteration of circulating dendritic cell subsets and its correlation with steroid treatment in patients with severe acute respiratory syndrome. *Clin Immunol*. 2005;116(3):225–35.
 148. Cook DN, Nakano H. Pulmonary Dendritic Cells. *Comp Biol Norm Lung Second Ed*. 2015;651–64.
 149. Jain S, Bakshi N, Krishnamurt L. Acute chest syndrome in children with sickle cell disease. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*. 2017;30(4).
 150. Ballas SK, Lieff S, Benjamin LJ, Dampier CD, Heeney MM, Hoppe C, et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2010;85(1):6–13.
 151. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(8):471–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3865>
 152. Brandes M, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ T cells. *Science* (80-). 2005;309(5732):264–8.
 153. Plattner BL, Doyle RT, Hostetter JM. Gamma-delta T cell subsets are differentially associated with granuloma development and organization in a bovine model of mycobacterial disease. *Int J Exp Pathol*. 2009;90(6):587–97.

154. Scott JP, Hillery CA, Brown ER, Misiewicz V, Labotka RJ. Hydroxyurea therapy in children severely affected with sickle cell disease. *J Pediatr*. 1996;128(6):820–8.
155. L P, Gulbis B, Dedeken L, Dupont S, Vanderfaeillie A. Survival Among Children and Adults With Sickle Cell Disease in Belgium: Benefit From Hydroxyurea Treatment. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;157(January):999–1010.
156. Samuel BC, Moore RD, Terrin ML, Steinberg MH, Dover GJ. Hydroxyurea and sickle cell anemia: clinical utility of a Myelosuppressive “switching” agent. *Medicine (Baltimore)*. 1996;75(6):300–26.
157. Takahashi K, Ip WKE, Michelow IC, Ezekowitz RAB. The mannose-binding lectin: A prototypic pattern recognition molecule. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(1):16–23.
158. Garred P, Nielsen MA, Kurtzhals JAL, Malhotra R, Madsen HO, Goka BQ, et al. Mannose-binding lectin is a disease modifier in clinical malaria and may function as opsonin for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Infect Immun*. 2003;71(9):5245–53.